

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**KEYLLA LENÇONE MISCHIATTI**

**BIOTRANSFORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
LEISHMANICIDA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ALCALOIDES  
QUINOLÍNICOS E DERIVADOS**

**CURITIBA  
2016**

**KEYLLA LENÇONE MISCHIATTI**

**BIOTRANSFORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
LEISHMANICIDA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ALCALOIDES  
QUINOLÍNICOS E DERIVADOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás H. de Oliveira

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Almeriane M. Weffort Santos

**CURITIBA  
2016**

Mischiatti, Keylla Lençone

Biotransformação e avaliação das atividades leishmanicida e anti-inflamatória de alcaloides quinolinicos e derivados/ Keylla Lençone Mischiatti – Curitiba, 2016.

158 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Brás H. de Oliveira

Coorientadora: Professora Dra. Almeriane M. Weffort Santos

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Biotransformação. 2. Fenilquinolina. 3. 2-*n*-pentilquinolina. 4. Citotoxicidade. 5. Leishmaniose.  
I. Oliveira, Brás H. de. II. Santos, Almeriane M. Weffort. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.19

# TERMO DE APROVAÇÃO

KEYLLA LENÇONE MISCHIATTI

Título: "BIOTRANSFORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ALCALOIDES QUINOLÍNICOS E DERIVADOS"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



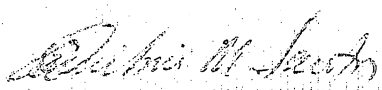
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
Orientador



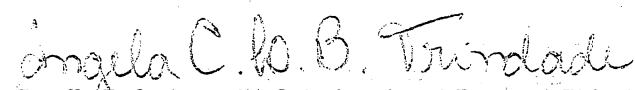
Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo  
Instituto de Pesquisa Pelé, Pequeno Príncipe



Profª. Drª. Glaucia Regina Martinez  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos  
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Angela Cristina Leal Badaró Trindade  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 23 de agosto de 2016.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Jair e Regina, à minha irmã Karina, ao meu esposo Anderson e ao maior presente que Deus me deu no decorrer deste doutorado, o meu filho Gabriel!

## **AGRADECIMENTOS**

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras, ainda, porque nos desafiam a construí-los. Por esta razão desejo expressar meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, por sempre guiar os meus passos, pela sabedoria, coragem e força que me proporcionou para superar minhas dificuldades e medos.

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira, pelo imprescindível e valioso apoio em todas as fases de execução deste trabalho, pela dedicação e ensinamentos, por todos os anos de trabalho juntos, a minha sincera gratidão e reconhecimento.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort Santos, minha querida co-orientadora, que contribuiu com inúmeras sugestões enriquecedoras para o fechamento completo do meu trabalho e por todo apoio ao qual me foi dado sempre que precisei.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel e a sua aluna, a doutoranda Mariana Porsani, por ter cedido os fungos para realização do trabalho e, também, pela posterior identificação dos mesmos.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucélia Donatti pelas análises de microscopia eletrônica.

Ao Prof. José Dias de S. Filho da UFMG pelas análises bidimensionais de RMN.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Produtos Naturais, que tive o prazer de conviver e aprender, Leopoldo Clemente Baratto, Karina Bora de Oliveira, Kelly C. Garcia e Assad Ullah.

À Karina Bora de Oliveira, que foi um grande presente que recebi durante essa caminhada: quero te agradecer pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos e por estar sempre presente ao meu lado.

Em especial, meus sinceros agradecimentos e gratidão às pessoas que são a base da minha vida. Aos meus pais Jair e Regina, pelo incondicional amor e incentivo, e por terem me educado e me preparado para a vida, me fortalecendo e ensinando com suas palavras e gestos a cada dia. Ao meu esposo, Anderson, meu eterno companheiro, pelo apoio e amor, pelos momentos mais felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis. À minha irmã e amiga, Karina, parceria fundamental em minha vida, pelo carinho e compreensão sempre.

Aos demais professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à CAPES/REUNI pela bolsa de doutorado e à Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade do título de Doutora.

## EPÍGRAFE

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”*

Leonardo da Vinci

## RESUMO

Tendo em vista a necessidade contínua de novas moléculas com potencial farmacológico e o crescente interesse pelas atividades biológicas de alcaloides quinolínicos, principalmente a leishmanicida, o objetivo deste trabalho foi produzir derivados da fenilquinolina e da pentilquinolina, por meio da ação de microrganismos, células de fungos e bactérias, visando modificações estruturais nessas substâncias. Do processo de biotransformação com a 2-*n*-pentilquinolina não houve obtenção de derivados. Das reações de biotransformação da 2-fenilquinolina com os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*, dois derivados foram obtidos e, respectivamente, denominados DFQ1, com hidroxilações nas posições C5 e C6, uma substância não descrita até o momento, e DFQ2, com uma hidroxilação na posição C4'. Primeiramente, esses derivados foram testados com relação à atividade antileishmania contra as formas promastigotas das linhagens *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* após 24, 48 e 72 h de tratamento. Os resultados demonstraram que a presença de um grupamento hidroxila na posição C4' alterou positivamente a atividade antileishmania para o derivado DFQ2 ( $CI_{50} > 100 \mu M$ ), com uma atividade citotóxica pelo menos cinco vezes superior à ação observada para a substância de origem fenilquinolina ( $CI_{50} > 500 \mu M$ ). Entretanto, a atividade citotóxica deste derivado foi consideravelmente menor que a observada para o derivado DFQ1 ( $CI_{50} < 10 \mu M$ ), demonstrando que a inserção de duas hidroxilas, nas posições C5 e C6, foram capazes de potencializar essa atividade duas mil vezes mais que a molécula original. Através da microscopia eletrônica de transmissão, foi possível visualizar as principais alterações provocadas nas estruturas intracelulares das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* pelos tratamentos com as substâncias DFQ1 e DFQ2. Com relação à atividade anti-inflamatória, embora com intensidade variável, todos os alcaloides testados apresentaram atividade inibitória sobre a quimiotaxia de polimorfonucleares humanos induzida pela caseína, sendo seus efeitos a  $5 \mu M$ , a maior concentração testada, consideravelmente elevados, sendo inclusive superior àquele demonstrado pela dexametasona, usada como fármaco padrão nas condições experimentais propostas, sugerindo uma ação adicional desses alcaloides na supressão do processo inflamatório. Coletivamente, os resultados aqui descritos demonstraram que as modificações na estrutura da 2-fenilquinolina são potencializadoras da ação leishmanicida dessa substância e, também, que os alcaloides dela derivados são capazes de interferir em pelo menos uma das etapas do processo inflamatório. Dessa forma, sugere-se que a ação deste grupo de substâncias no tratamento da leishmaniose afeta diretamente o parasito e pode, também, influenciar o processo inflamatório gerado, o que é um dos agravantes principais da doença.

**Palavras-chave:** biotransformação, 2-fenilquinolina, 2-*n*-pentilquinolina, citotoxicidade, leishmaniose



## ABSTRACT

Having in mind the continuous need of new molecules with pharmacological potential and the growing interest in biological activities of quinolinic alkaloids, mainly leishmanicide, the objective of this work was to produce derivatives of phenylquinoline and pentyquinoline potentially more efficient through the action of micro-organisms, fungal cells and bacteria, aiming structural modifications of these substances. The procedures of biotransformation with 2-*n*-pentyquinoline there was no obtaining derivatives. Through the biotransformation reactions of 2-phenylquinoline with *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*, two derivatives were obtained and respectively called DFQ1 with hydroxylation at C5 and C6 positions, which led to a substance not described to date, and DFQ2 with a hydroxylation at the C4' position. Firstly, these derivatives were tested for anti-leishmania activity against the promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. infantum* and *L. braziliensis* lineages after 24, 48 and 72 hours of treatment. The results demonstrated that the insertion of a hydroxyl group at the C4' position positively changed the anti-leishmania activity for the derivative DFQ2 ( $IC_{50} > 100 \mu M$ ), with a cytotoxic activity at least five times higher than the activity observed for the original phenylquinoline compound ( $IC_{50} > 500 \mu M$ ). However, the cytotoxic activity of this derivative was considerably lower than that observed for the derived DFQ1 ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ), demonstrating that the insertion of two hydroxyls at C5 and C6 positions was able to potentiate the activity two thousand times more than the original molecule. By transmission electron microscopy, it was possible to view the main changes caused in the intracellular structures of promastigotes of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* by treatment with DFQ1 and DFQ2 substances. With regard to the anti-inflammatory activity, although to varying degrees, all alkaloids and quinolines tested showed inhibitory activity on the chemotaxis of human polymorphonuclear induced by casein, being their effect on  $5 \mu M$ , the highest concentration tested, surprisingly high, and being even higher than those shown by dexamethasone, used as standard drug in the proposed experimental conditions, suggesting an additional action of these alkaloids in the suppression of the inflammatory process. Collectively, the results described herein demonstrate that changes in the 2-phenylquinoline structure are intensifiers of this substance leishmanicide action, and also that its alkaloid derivatives are capable of interfering with at least one of the steps of the inflammatory process. Thus, it is suggested that the action of this group of compounds in the treatment of leishmaniasis directly affects the parasite and can also influence the inflammatory process generated, which is a major worsening of the disease.

**Keywords:** biotransformation, 2-phenylquinoline, 2-*n*-pentyquinoline, cytotoxicity, leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DAS <i>LEISHMANIAS</i> .....	33
FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO DAS FORMAS ADAPTATIVAS DE <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	35
FIGURA 3- EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO.....	39
FIGURA 4- (A) ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [200 MHZ, EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DA 2-FENILQUINOLINA; (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 7,40 E 8,45 PPM.....	72
FIGURA 5- (A) ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO], DA 2-FENILQUINOLINA; (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 119,0 E 160,0 PPM. ....	74
FIGURA 6- (A) ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [400 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1. (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 3,90 A 8,30 PPM. ....	78
FIGURA 7- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [400 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1 .....	79
FIGURA 8- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [400 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1 .....	79
FIGURA 9- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [400 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1 (7,00 - 8,20 PPM). ....	80
FIGURA 10- ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1.....	81
FIGURA 11- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1 (70,0 - 77,0 PPM). ....	81
FIGURA 12- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DO DFQ1 (110,0 - 157,0 PPM). ....	82
FIGURA 13- ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1.....	82
FIGURA 14- ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO] DE DFQ1 (70,0 - 145,0 PPM). .	83
FIGURA 15- CORRELAÇÕES ENCONTRADAS NO ESPECTRO HSQC DE DFQ1.....	84
FIGURA 16- MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC, DE DFQ1 EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO. ....	85
FIGURA 17- (A) EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DE DFQ1 ENTRE 6,2-8,4 PPM. (B) EXPANSÃO REGIÃO 4,1-5,2 PPM. ....	86
FIGURA 18- CORRELAÇÕES HMBC OBSERVADAS PARA DFQ1.....	87
FIGURA 19- MAPA DE CORRELAÇÃO PARA DFQ1 EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO.....	88
FIGURA 20- (A) EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC ENTRE 3,5-5,4 PPM. (B) EXPANSÃO ENTRE 5,5-8,5 PPM. ....	89
FIGURA 21- MAPA DE CORRELAÇÃO COSY PARA DFQ1 EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO. ....	90
FIGURA 22- MAPA DE CORRELAÇÃO NOESY DE DFQ1 EM (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO.....	91
FIGURA 23- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE NOESY DE DFQ1 ENTRE 7,7-8,2 PPM. ....	92
FIGURA 24- - EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE NOESY DE DFQ1 ENTRE 4,3- 5,0 PPM. ....	93
FIGURA 25- (A) ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H [400 MHZ, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO], DE DFQ2. (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 7,00 A 8,40 PPM. ....	97

FIGURA 26- (A) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ [400 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2 NA REGIÃO ENTRE 7,00 E 7,80 PPM. (B) EXPANSÃO NA REGIÃO ENTRE 7,90 E 8,35 PPM. ....	98
FIGURA 27- ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ [50 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2. ....	99
FIGURA 28- (A) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ [50 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2 NA REGIÃO ENTRE 115,0 A 130,0 PPM. (B) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE NA REGIÃO ENTRE 135,0 A 162,0 PPM.....	100
FIGURA 29- (A) ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2. (B) EXPANSÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO ENTRE 110,0 A 140,0 PPM. ....	101
FIGURA 30- CORRELAÇÕES ENCONTRADAS NO MAPA HSQC DE DFQ2.....	103
FIGURA 31- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DE DFQ2 ENTRE 6,7-8,6 PPM. ....	103
FIGURA 32- CORRELAÇÕES HMBC OBSERVADAS PARA DFQ2. ....	104
FIGURA 33- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC DE DFQ2 ENTRE 7,00 - 8,5 PPM. ....	105
FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ [200 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DA 2- <i>N</i> -PENTILQUINOLINA. ....	108
FIGURA 35- ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ [50 MHZ, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DA 2- <i>N</i> - PENTILQUINOLINA... ..	110
FIGURA 36 - GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> (I), <i>L. braziliensis</i> (II) E <i>L. infantum</i> (III). ....	112
FIGURA 37 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> TRATADAS COM O DFQ1.....	115
FIGURA 38 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> TRATADAS COM DFQ1.....	116
FIGURA 39 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> TRATADAS COM O DFQ2.....	117
FIGURA 40 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. braziliensis</i> TRATADAS COM DFQ2.....	118
FIGURA 41 – GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE MACRÓFAGOS RAW. ....	120
FIGURA 42 – GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE CÉLULAS MCCOY.....	121
FIGURA 43 - EFEITO DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A VIABILIDADE DE GRANULÓCITOS HUMANOS. ....	124
FIGURA 44 - EFEITO DAS 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A VIABILIDADE DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS. ....	125
FIGURA 45 - POLARIZAÇÃO LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR CASEÍNA.....	127

FIGURA 46 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS SUBSTÂNCIAS FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS HUMANOS.	130
FIGURA 47 - AÇÃO DA FITO-HEMAGLUTININA SOBRE A MORFOLOGIA DE LINFÓCITOS.	134
FIGURA 48 - AÇÃO DA FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A MORFOLOGIA E A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.	135
FIGURA 49 - ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO.	138
FIGURA 50 - EFEITO DA FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 EM ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE LESÃO <i>IN VITRO</i> .	142
FIGURA 51 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 24 H DE CULTURAS CONFLUENTES DE CÉLULAS MCCOY A FENILQUINOLINA E SEUS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2.	143

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MICRORGANISMOS USADOS NOS EXPERIMENTOS EM ESCALA ANALÍTICA	57
TABELA 2- DADOS DE RMN <sup>1</sup> H DA 2- FENILQUINOLINA .....	71
TABELA 3- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DA 2- FENILQUINOLINA .....	73
TABELA 4- DADOS DE RMN <sup>1</sup> H DE (DFQ1) OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO <i>Aspergillus fumigatus</i> E DA FENILQUINOLINA (FQ).....	77
TABELA 5- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DO DERIVADO 1 DA FENILQUINOLINA OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DA FENILQUINOLINA POR <i>Aspergillus fumigatus</i> . ....	83
TABELA 6- DADOS DE RMN <sup>1</sup> H DE DFQ2 OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO PELO FUNGO <i>Aspergillus flavus</i> E DA 2-FENILQUINOLINA .....	96
TABELA 7- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C E DEPT 135 DE DFQ2 OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO <i>A. flavus</i> .....	102
TABELA 8- DADOS DE DE RMN <sup>1</sup> H DA 2- <i>N</i> -PENTILQUINOLINA .....	107
TABELA 9- DADOS DE RMN <sup>13</sup> C DA 2- <i>N</i> -PENTILQUINOLINA .....	109
TABELA 10- VALORES DE CI <sub>50</sub> ± DP DA 2-FENILQUINOLINA (FQ) E SEUS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2, <i>N</i> -METILGLUCAMINA (GLUCANTIME®) E ANFOTERICINA B, AVALIADOS CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i> , PELO MÉTODO DO MTT.....	111
TABELA 11- INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM A FENILQUINOLINA (FQ), DFQ1 E DFQ2 SOBRE A EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-4 E VLA-5 SOBRE AS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS HUMANOS .....	139

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA (XIII) EM 11 $\alpha$ - HIDROXIPROGESTERONA (XIV) .....	25
ESQUEMA 2- REAÇÃO DE SÍNTESE DA 2-FENILQUINOLINA .....	55
ESQUEMA 3- REAÇÃO DE SÍNTESE DA 2-N-PENTILQUINOLINA .....	56
ESQUEMA 4- MODIFICAÇÕES NA 2-FENILQUINOLINA APÓS REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO <i>Aspergillus fumigatus</i> . ....	94
ESQUEMA 5- MODIFICAÇÕES NA 2-FENILQUINOLINA POR REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO <i>Aspergillus flavus</i> . ....	106

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Meio ágar batata dextrose
BSA	Soro Albumina Bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDC	Cromatografia em camada delgada centrífuga
CD	Grupamento de diferenciação
CI <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
CI <sub>90</sub>	Concentração que inibe 90% da viabilidade celular
COSY	Espectroscopia de correlação
Cq	Carbono quaternário
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto duplo
DEPT	Intensificação sem distorção por transferência de polarização
DEXA	Dexametasona
DFQ1	Derivado 1 da 2-fenilquinolina
DFQ2	Derivado 2 da 2-fenilquinolina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EM	Espectrometria de massas
ESY	Ionização por eletrospray
FQ	2-Fenilquinolina
FSC	<i>Forward side scatter</i>
GNC	Granulócitos
HEX	Hexano
HLA	Antígeno leucocitário humano
HMBC	Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HSQC	Espectroscopia de coerência heteronuclear <i>Single-Quantum</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
La	<i>Leishmania amazonensis</i>
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>
LFA-1	Função de leucócito associado ao antígeno 1

Li	<i>Leishmania infantum</i>
m	Múltiplo
m/z	Relação massa/carga
M199	Meio de cultura 199
MHz	Mega Hertz
MNC	Células mononucleares
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fito-hemaglutinina
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
ppm	Partes por milhão
RAW	Linhagem de macrófagos murinos
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Simpleto
SFB	Soro fetal bovino
sl	Simpleto largo
SSC	<i>Side light scatter</i>
t	Tripleto
T.A.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UV-VIS	Ultravioleta-visível
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular
VLA	<i>Very Late Antigen</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i>
VLA-5	<i>Very Late Antigen 5</i>
$\delta$	Deslocamento químico



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1	A UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS .....	19
1.1.1	Atividades biológicas da <i>Galipea longiflora</i> .....	21
1.2	BIOTRANSFORMAÇÃO .....	24
1.2.1	Aspectos gerais .....	24
1.2.2	Microrganismos no processo de biotransformação .....	27
1.3	LEISHMANIOSE .....	31
1.3.1	Aspectos gerais .....	31
1.3.2	Ciclo biológico do parasito .....	32
1.3.3	Morfologia .....	33
1.3.4	Formas clínicas da leishmaniose .....	36
1.4	INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	38
1.4.1	Quimiotaxia .....	39
1.4.2	A resposta imune .....	41
1.4.3	Adesão celular .....	45
1.4.3.1	Integrinas .....	46
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	49
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>50</b>
3.1	Procedimentos gerais .....	50
3.1.1	Instrumentação .....	50
3.1.2	Técnicas cromatográficas .....	51
3.1.3	Solventes .....	51
3.1.4	Soluções .....	51
3.1.4.1	Solução salina fisiológica .....	52
3.1.4.2	Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) .....	52
3.1.4.3	Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v) .....	52
3.1.4.4	PBS suplementado (PBSS) .....	52
3.1.4.5	Solução hemolisante de Gey .....	52
3.1.4.6	Meio RPMI 1640 .....	53
3.1.4.7	Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano ....	53
3.1.4.8	Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino	53
3.1.4.9	Meio com fito-hemaglutinina (M-PHA) .....	53
3.1.4.10	Solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (v/v) .....	53
3.1.4.11	Solução de caseína a 5% (p/v) .....	54
3.1.4.12	Solução de Tripsina a 0,25% (p/v) .....	54
3.2	SUBSTRATOS .....	54
3.2.1	Obtenção da 2-fenilquinolina .....	54
3.2.2	Obtenção da 2- <i>n</i> -pentilquinolina .....	55
3.3	REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO .....	56
3.3.1	Biotransformação em escala analítica ( <i>screening</i> ) .....	56
3.3.1.1	Microrganismos .....	56

3.3.1.2	Triagem de microrganismos em escala analítica .....	56
3.3.1.3	Reações de biotransformação em escala preparativa com o substrato 2-fenilquinolina .....	58
3.3.1.4	Biotransformação por <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	58
3.3.1.5	Biotransformação por <i>Aspergillus flavus</i> .....	59
3.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	59
3.4.1	Atividade leishmanicida.....	59
3.4.1.1	Cepa do parasito e cultura celular .....	59
3.4.1.2	Ensaio de susceptibilidade das formas promastigotas .....	60
3.4.1.3	Tratamento <i>in vitro</i> .....	60
3.4.1.4	Ensaio de viabilidade .....	61
3.4.1.5	Citotoxicidade em macrófagos.....	61
3.4.1.6	Citotoxicidade em células McCoy .....	62
3.4.1.7	Análise por microscopia eletrônica de transmissão .....	62
3.4.2	Atividade anti-inflamatória .....	63
3.4.2.1	Obtenção de leucócitos humanos.....	63
3.4.2.2	Separação das populações de leucócitos humanos .....	63
3.4.2.3	Viabilidade e citotoxicidade celulares .....	64
3.4.2.4	Preparo de citrocentrifugados .....	64
3.4.2.5	Coloração de MAY-GRUNWALD-GIEMSA.....	65
3.4.2.6	Polarização leucocitária .....	65
3.4.2.7	Quimiotaxia de granulócitos.....	65
3.4.2.8	Ensaio de imunomodulação.....	66
3.4.2.9	Ativação de linfócitos avaliada morfologicamente .....	67
3.4.2.10	Expressão de moléculas de adesão na superfície dos leucócitos .....	67
3.4.2.11	Avaliação da migração celular .....	68
3.4.2.12	Análise estatística .....	69
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
4.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 2-FENILQUINOLINA .....	70
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DA FQ.....	75
4.2.1	Caracterização do metabólito DFQ1 obtido por biotransformação da FQ pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> . .....	75
4.2.2	Caracterização do metabólito obtido por biotransformação da 2-fenilquinolina com o fungo <i>Aspergillus flavus</i> .....	95
4.3	Caracterização da 2- <i>n</i> -pentilquinolina .....	106
4.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	111
4.4.1	Atividade leishmanicida.....	111
4.4.1.1	Ação <i>in vitro</i> da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 sobre formas promastigotas de leishmanias.....	111
4.4.1.2	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	114
4.4.1.2.1	Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> devido ao tratamento com a substância DFQ1 .....	114
4.4.1.2.2	Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> devido ao tratamento com a substância DFQ1 .....	115
4.4.1.2.3	Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> devido ao tratamento com a substância DFQ2 .....	117
4.4.1.2.3	Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> devido ao tratamento com a substância DFQ2 .....	118

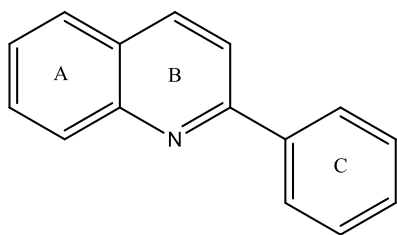
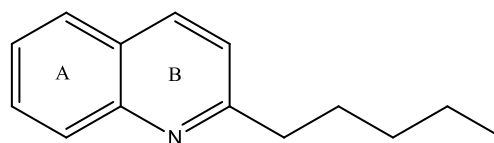
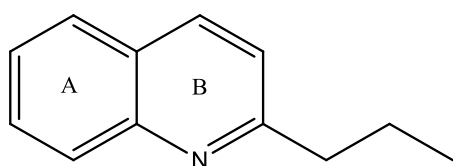
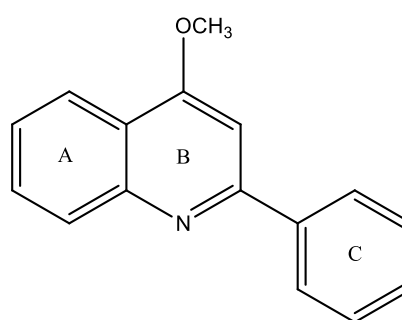
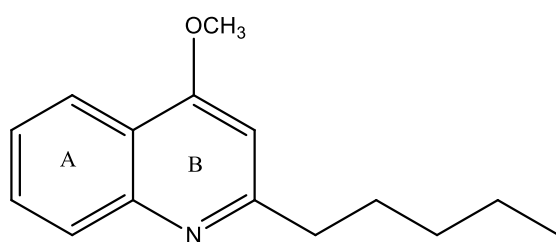
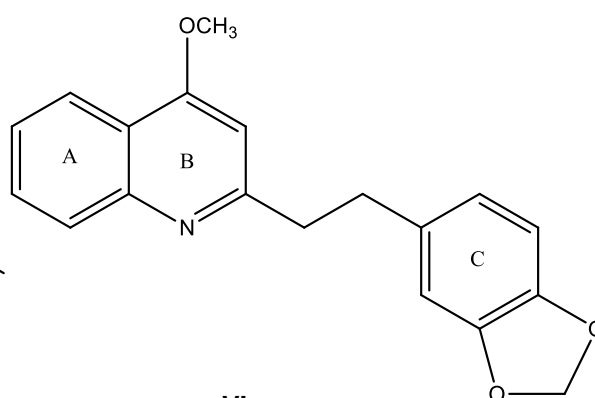
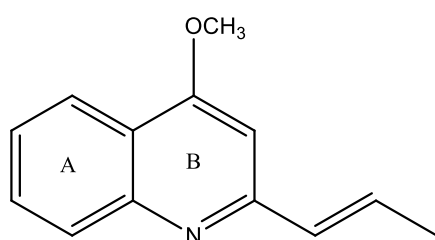
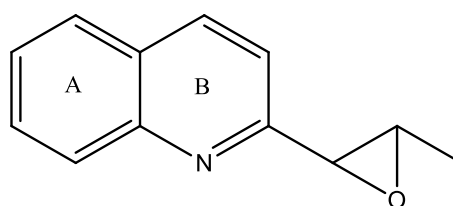
4.4.1.3	Citotoxicidade em macrófagos Raw e fibroblastos McCoy .....	119
4.4.1.4	Citotoxicidade em células McCoy .....	121
4.4.3	Atividade anti-inflamatória .....	122
4.4.3.1	Efeito de FQ, DFQ1 e DFQ2 sobre mononucleares e granulócitos humanos .....	122
4.4.3.2	Polarização leucocitária .....	125
4.4.3.3	Quimiotaxia .....	128
4.4.3.4	Imunomodulação .....	132
4.4.3.5	Efeito da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 na expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos periféricos por citometria de fluxo.....	136
4.4.3.6	Avaliação da migração celular .....	140
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>144</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>146</b>

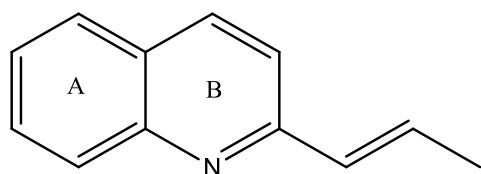
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

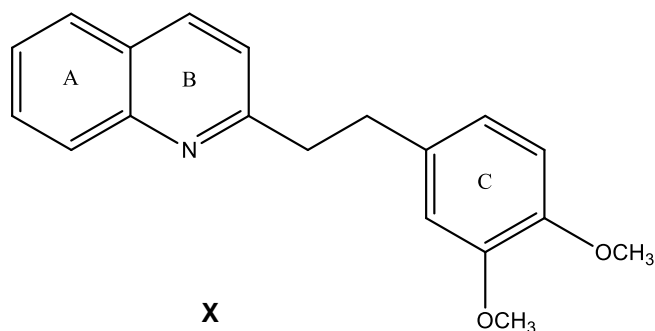
As plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e, devido a sua grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, podem ser modelo para síntese de inúmeros fármacos (NODARI e GUERRA, 2000).

É de suma importância estudos visando o desenvolvimento de novos medicamentos que tenham componentes extraídos de plantas como princípios ativos. Entre estas substâncias estão os alcaloides encontrados em plantas pertencentes ao gênero *Galipea*, este gênero possui em torno de quarenta espécies distribuídas desde a Guatemala e Cuba até a Bolívia e Sul do Brasil (GIMENEZ *et al.*, 2005). Uma das espécies mais estudadas é *Galipea longiflora* Krause, uma planta pertencente à família Rutaceae, sendo uma árvore que cresce até doze metros de altura. Esta espécie apresenta folhas trifolioladas alternadas ou superpostas sobre o mesmo ramo, com um pecíolo frequentemente alado, com flores que aparecem na forma cachos (BOURDY *et al.*, 2000). Na Bolívia, esta planta é comumente conhecida como "Evanta" e tem sido usada como agente antiparasitário pelos Tacana, Mosekene e Tsimane, grupos étnicos da Amazônia, principalmente para tratar ulcerações cutâneas ocasionadas pela leishmaniose. Estudos fitoquímicos com essa planta revelaram a presença de alcaloides como constituintes principais, alguns com pronunciada ação antileishmaniose (FOURNET *et al.*, 1994b). Os alcaloides quinolínicos majoritários já extraídos da *G. longiflora* são: **I** 2-fenilquinolina (FQ), **II** 2-*n*-pentilquinolina (PQ), **III** 2-*n*-propilquinolina, **IV** 4-metoxi-2-fenilquinolina, **V** 4-metoxi-2-pentilquinolina, **VI** 4-metoxi-2-(3,4-metilendioxifeniletíl)-quinolina, **VII** 4-metoxi-2-(*E*)-prop-1'-enilquinolina (chimanina C), **VIII** *trans*-epoxipropilquinolina (chimanina D), **IX** 2-propenilquinolina (chimanina B) e **X** 2-(3,4-dimetoxifeniletíl)-quinolina, **XI** 2-(3,4-metilendioxifeniletíl)-quinolina, **XII** skimianina (GIMENEZ *et al.*, 2005; FOURNET *et al.*, 1994b).

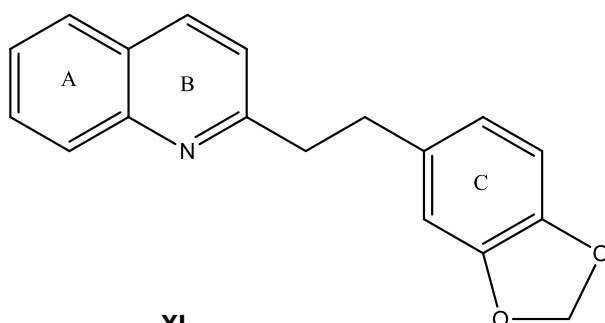
**I****II****III****IV****V****VI****VII****VIII**



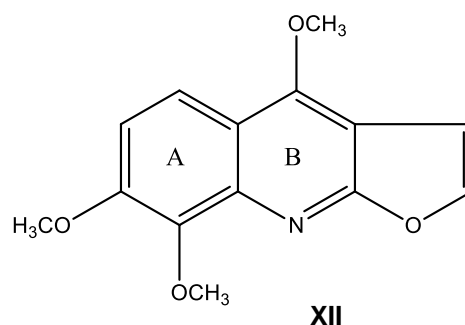
IX



X



XI



XII

### 1.1.1 Atividades biológicas da *Galipea longiflora*

A terapia de pacientes com leishmaniose é ainda um sério problema e tem sido baseada no uso de metais pesados, particularmente substâncias antimoniais. Os fármacos de escolha para o tratamento de leishmanioses são o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®, Rhodia, Brasil) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®, Wellcome, Inglaterra), ambos antimoniais pentavalentes usados mundialmente desde 1915. Embora eficazes essas substâncias apresentam efeitos tóxicos inconvenientes. Classicamente, são descritos sinais de intolerância do tipo alérgico, geralmente precoces e independentes da dose, ocorrendo no início do tratamento e cessando com a sua interrupção. Ocorre hipersensibilidade imediata (febre, calafrios, mialgia, artralgia, tosse, erupção cutânea e cefaléia), o que geralmente não justifica a interrupção da terapia. Os sinais de intoxicação são mais comuns no final do tratamento e traduzem uma superdosagem (sinais de toxicidade cardíaca, renal, pancreática e hematológica) (MASMOUDI, 2005). Quando o tratamento com os antimoniais não se mostra efetivo, fármacos alternativos como

pentamidina, anfotericina B e azitromicina são utilizados, porém também acarretam alta toxicidade e sérios efeitos adversos (GUILLON *et al.*, 2007., MANSUETO *et al.*, 2014) ). Apesar de acarretar problemas gastrointestinais severos (PRASAD *et al.*, 2004), o miltefosina, um fármaco originalmente desenvolvido como agente antineoplásico, tem sido utilizado para o tratamento de leishmaniose com alta efetividade, mesmo em infecções resistentes ao tratamento com os antimoniais (SOTO e TOLEDO, 2007).

Como a terapia para o tratamento da leishmaniose apresenta diversos efeitos colaterais, existe uma necessidade no desenvolvimento de novas substâncias, eficientes e seguras.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças parasitárias especialmente a *G. longiflora*, é muito comum em alguns lugares endêmicos, principalmente entre as tribos indígenas da América do Sul (GIMENEZ *et al.*, 2005; FOURNET *et al.*, 1994a). Estudos demonstraram que as cascas e folhas da planta, que são utilizadas pelos indígenas na forma de emplastos nas lesões cutâneas ocasionadas pela leishmaniose, apresentam alcaloides quinolínicos com atividade leishmanicida, avaliadas na forma promastigota de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. chagasi* (GIMENEZ *et al.*, 2005).

Em estudos de investigação etnofarmacológica na Bolívia pelo grupo de Fournet (1994b), observou-se que alcaloides 2-aril e 2-alkilquinolínicos isolados de *G. longiflora* detém atividade leishmanicida *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. brasiliensis* e *L. donovani*. De doze alcaloides isolados, somente a 2-*n*-propilquinolina (CI<sub>90</sub> 50 µg/mL); a chimanina D (CI<sub>90</sub> 50 µg/mL) e a chimanina B (CI<sub>90</sub> 25 µg/mL) apresentaram maior ação leishmanicida. Todas essas substâncias possuem estrutura química com substituintes na posição 2 do anel B. A atividade antileishmania *in vivo* da FQ (I) e da PQ (II), duas substâncias majoritárias da planta, foi realizada através do modelo de pata de rato infectada com as cepas PH8 e H-142 de *L. amazonensis*. Os resultados demonstraram que a FQ, o alcaloide presente em maior concentração na planta, foi mais ativo nos estudos *in vivo* do que *in vitro* contra as formas extracelulares de *Leishmania* sp. A resposta ao tratamento das lesões induzidas nos ratos infectados com *L. amazonensis* (H-142) foi a

mesma para FQ e para o Glucantime®, medicamento utilizado como referência. Entretanto, esta atividade não foi equivalente quando os ratos foram infectados com a forma PH8 de *L. amazonensis*. Esses dados demonstraram que a resposta da FQ pode ser diferente em função da infectividade da cepa de leishmania em estudo. A PQ, outro alcaloide majoritário na planta, não demonstrou efeito farmacológico quando administrado nos animais infectados.

Estudos recentes também demonstraram que além do potencial leishmanicida, o extrato de Evanta e a FQ, interferiram também na ativação dos linfócitos do indivíduo infectado, interferindo com a proliferação e produção de IFN- $\gamma$  induzida por anticorpos anti-CD3 e concanavalina A, o que implica no controle da resposta inflamatória observada na infecção crônica por leishmania (CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2009).

Estudos atuais também demonstraram que alcaloides quinolínicos isolados da *Galipea* suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e controlam a inflamação *in vivo* no tratamento de infecções ocasionadas por leishmania em ratos. Nesse contexto, verificou-se que, *in vitro* e *in vivo*, o tratamento com o extrato rico em alcaloides de Evanta reduziu a resposta de linfócitos de memória mediada pela produção de IFN- $\gamma$  (55% e 63% de redução em comparação com células não tratadas, respectivamente). Além do IFN- $\gamma$ , a produção de IL-12 e TNF também foi suprimida (CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2013a). Esses estudos sugerem que a resposta inflamatória e a resposta imune anti-inflamatória é primordial para um efetivo controle da lesão observada na leishmaniose.



## 1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO

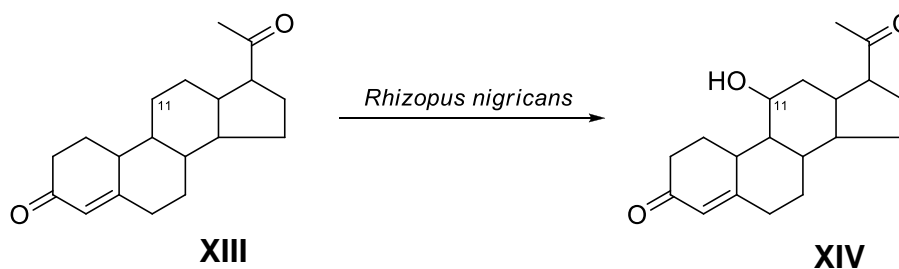
### 1.2.1 Aspectos gerais

Biotransformações e biocatálise são conversões químicas catalisadas por enzimas (SHAW *et al.*, 2003). Esses métodos são uma ferramenta importante na síntese orgânica, especialmente na obtenção de moléculas quirais por sínteses assimétricas ou por resolução de racematos.

A biotransformação compreende a metabolização de xenobióticos entendidos como fármacos e/ou outras substâncias químicas estranhas ao organismo.

Nos processos de biotransformação, o procedimento mais utilizado é realizado com células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados. Plantas, protozoários e insetos também podem ser utilizados além de enzimas puras, isoladas de diferentes fontes, muitas delas disponíveis comercialmente. No entanto, essas últimas são bastante onerosas, uma vez que, além da enzima, é necessário o uso de um ou mais cofatores para que a mesma seja ativa (FABER, 2011).

O uso de biocatalisadores naturais não é nada novo. Eles vêm sendo utilizados há muito tempo, sendo o primeiro uso de biotransformação descrito por Pasteur em 1858, quando foi obtido o L-tartarato de amônio a partir do DL-tartarato de amônio utilizando o fungo *Penicillium glaucum* (HANSON, 1992). Outra biotransformação extremamente importante e que marcou o início dos processos de biocatálise foi realizada em 1952, por Peterson e Murray, os quais realizaram a hidroxilação na posição 11- $\alpha$  da progesterona (**XIII**) com o fungo *Rhizopus nigricans*, que levou à formação da 11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**XIV**), conforme esquema 1. Essa reação foi decisiva para a síntese de hormônios adrenocorticóides de forma economicamente viável (STOUDT, 1960).



ESQUEMA 1- BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA (**XIII**) EM 11 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA (**XIV**)  
 FONTE: STOUDET, 1960.

Os biocatalisadores têm se tornado mais acessíveis e de fácil obtenção e manuseio. Sua eficiência em realizar diversas reações químicas, até as mais difíceis de serem obtidas pelos métodos tradicionais, como a modificação de grupos pouco ativados e a introdução de funções orgânicas, principalmente hidroxilações, em carbonos  $sp^3$  remotos e funções pré-existentes, têm sido o grande atrativo para sua aplicação em sínteses químicas em múltiplas etapas (STRAATHOF *et al.*, 2002).

A seletividade apresentada pelos biocatalisadores naturais, o amplo espectro de substâncias químicas que são aceitas como substratos para as reações, o custo, as condições amenas e ecologicamente corretas, conferem aos mesmos algumas características fundamentais para sua utilização. Nos últimos anos, a biocatálise têm explorado conhecimentos de áreas como a biologia molecular, com o intuito de desenvolver biocatalisadores mais ativos, estáveis e seletivos, passíveis de serem utilizados pela indústria a um custo mais acessível (FABER, 2011).

Segundo Loughlin (2000) as principais vantagens do uso de enzimas na síntese orgânica são: (A) catálises eficientes, sendo o processo da reação mais rápido quando comparado à catálise química e as enzimas podem ser efetivas mesmo em baixas concentrações molares; (B) Reações sob condições suaves, numa faixa de temperatura entre 20-40°C e pH neutro (em torno de 7,0), minimizando reações indesejadas, tais como rearranjos e reações laterais; (C) ação catalítica sobre um grande número de substratos em locais de difícil acesso por meio sintético; (D) na química verde, um importante aliado em favor das questões ambientais; (E) seletividades tais como:

- ❖ Quimiosseletividade: algumas enzimas podem reagir com um único grupo funcional, mesmo na presença de outros grupos reativos, culminando em produtos reacionais mais “limpos”, facilitando o processo de purificação;
- ❖ Regiosseletividade: devido à sua estrutura tridimensional complexa, podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato;
- ❖ Enantiosseletividade: quase todas as enzimas são formadas a partir de L-aminoácidos, portanto são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecido na formação do complexo enzima-substrato. Sendo assim, um substrato pró-quiral pode ser transformado em um produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmicos.

A principal desvantagem dos sistemas de transformações microbianas é a imprevisibilidade do processo. A fim de maximizar as chances de se obter um produto particular ou de obtenção de grande variação de produtos, é frequentemente necessário utilizar uma ampla variedade de microrganismos na triagem inicial (ARAKAWA, 2007).

Em geral nos processos industriais, a biotransformação ou biocatálise é obtida por caminhos tradicionais, que consistem desde a identificação de fontes dos microrganismos, seleção de eficientes biocatalisadores, desenvolvimento e otimização de processos da escala laboratorial à planta piloto. Uma pesquisa prévia em bibliotecas de substâncias orgânicas, enzimas e microrganismos, também tem sido empregada pela denominada Química Combinatória Quimioenzimática (*Chemoenzymatic Combinatorial Chemistry*). Esta tecnologia tem como base a integração de processos enzimáticos interfaciais, transformações microbianas e reações químicas, desta forma interconectando a catálise química com a biocatálise (CONTI *et al.*, 2001).

Os procedimentos de avaliação e seleção de microrganismos, de plantas ou de células animais representam o método tradicional de descoberta de novos biocatalizadores. Os microrganismos são de particular interesse devido ao curto período de geração, a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas. Além disso, há uma infinidade de microrganismos na

natureza que podem ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Estes modificam e degradam uma gama de moléculas orgânicas complexas e, então, é de se esperar que pelo menos um deles catalise uma dada reação de interesse (CONTI *et al.*, 2001; FARNET e ZAZOPOULOS, 2005).

As reações de biotransformações são realizadas empregando-se células íntegras de organismos vivos (como plantas) ou microrganismos (leveduras, bactérias e fungos) (NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004; LAM, 2007). Esses compreendem uma enorme diversidade em espécies e inúmeras aplicações biológicas apresentadas na literatura (STROBEL e DAISY, 2003).

### 1.2.2 Microrganismos no processo de biotransformação

Os microrganismos são extremamente importantes para a humanidade por inúmeras razões, tais como participação em reflorestamentos (micorrizas), fermentação para a produção de alimentos, ciclosporinas, penicilina e outras substâncias biologicamente ativas. As principais características dos microrganismos que os tornam úteis para a produção de tais compostos, os quais poderiam ser obtidos de plantas ou ainda serem sintetizados *in vitro* por vias químicas, é a alta razão superfície/volume, que facilita o rápido consumo de nutrientes para seu metabolismo e biossíntese; a ampla variedade de reações que os mesmos são capazes de realizar; a grande facilidade de adaptação nos mais diferentes ambientes, permitindo o seu transporte da natureza para meios artificiais, no qual eles são capazes de crescer utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo e produzir compostos de interesse; a simplicidade de procedimentos de *screening*, permitindo examinar milhares de culturas em um tempo razoavelmente curto; e a ampla diversidade de espécies, produzindo diferentes enzimas, que podem catalisar as mesmas reações, permitindo assim, um monitoramento diferenciado nas condições de cultivo (ADRIO e DEMAINE, 2005).

Os fungos têm sido uma fonte muito rica de fármacos ou pró-fármacos importantes, incluindo antibióticos antibacterianos ( $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e glicopeptídeos), antibióticos-antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácidos

aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), entre outros (DEMAIN, 1999; NEWMAN *et al.*, 2000).

O metabolismo secundário dos fungos é rico em diferentes classes de substâncias, desde terpenoides, alcaloides e também policetídeos como zearalenonas, antraquinonas, alquiorescínóis e meroterpenos, dentre outras. Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos foi obtido de fungos (KONGSAEREE *et al.*, 2003). Estes microrganismos desenvolvem-se como células únicas (leveduras) ou como colônias filamentosas multicelulares (fungos filamentosos, bolores e cogumelos). O termo “crescimento” refere-se ao aumento no número de células e não ao aumento das dimensões celulares. O crescimento populacional é definido como o aumento do número, ou da massa microbiana. Quando uma cultura microbiana desenvolve-se em um sistema fechado, pode-se confeccionar uma curva de crescimento, a qual pode ser dividida em diferentes etapas:

- ❖ Fase de latência (ou *lag phase*) é o período variável, onde não há um aumento significativo da população; nesta fase, há adaptação da célula ao novo meio ou ambiente;
- ❖ Fase logarítmica ou (*log phase*) é a etapa onde as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, duplicando-se, portanto, aumentando sua população.
- ❖ Fase estacionária é aquela em que os nutrientes estão em escassez e os produtos tóxicos estão se tornando mais abundantes. Nesta etapa não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Nesta fase são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem as enzimas;
- ❖ Fase de declínio é aquela em que a maioria das células estão em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. A contagem total do número de indivíduos da população permanece relativamente constante, enquanto as variáveis caem lentamente (MADIGAN *et al.*, 2000).

Em processos industriais que visam à obtenção de produtos microbiológicos, usa-se o método de crescimento contínuo de células. Nesses casos, tem-se o interesse em manter as células na fase *log* ou estacionária (MADIGAN *et al.*, 2000).

Os fungos têm sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, pois são de fácil manejo, crescimento rápido e utilizam meios bem caracterizados quimicamente. Podem produzir enzimas como lipases, invertases, lacases, amilases, entre outras. Essas enzimas hidrolisam o substrato tornando-os assimiláveis através de mecanismos de transporte ativo e passivo.

Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples, como a D-glucose, e sais minerais, como sulfatos e fosfatos. Outros elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. No entanto, alguns fungos requerem fatores de crescimento, que não conseguem sintetizar, em especial vitaminas, como a tiamina. Os fungos necessitam de água para o seu desenvolvimento, sendo alguns halofíticos, crescendo em ambientes com elevada concentração de sal (TRABULSI *et al.*, 1996; FARNET e ZAZOPOULOS, 2005).

Algumas espécies de fungos são patogênicas, mas a grande maioria participa de processos biotecnológicos importantes para os seres humanos. O gênero *Penicillium*, por exemplo, é reconhecido por ser amplamente disperso no ambiente, com mais de 225 espécies, as quais, em geral, são consideradas principalmente fungos do solo, cuja função principal é a decomposição. Suas espécies são de grande importância para os ecossistemas, a agricultura e a biotecnologia. A descoberta dos antibióticos de uso clínico começou com a descoberta da eficácia da penicilina, um composto  $\beta$ -lactâmico. Muitos outros metabólitos biológicos como, antibióticos, antifúngicos e imunossupressores, têm sido descobertos a partir de metabólitos de cepas de *Penicillium*. Além disso, várias espécies de *Penicillium* são importantes agentes causadores de infecção por causa da produção de micotoxinas (NAKASHIMA *et al.*, 2008).

Fungos filamentosos têm sido extremamente úteis em processos de biotransformação (ZELINSKI e HAUER, 2002). As habilidades desses microrganismos em realizar hidroxilações régio e estereosseletivas em triterpenos esteroidais, por exemplo, são bem conhecidas e consistem em um método de bioconversão amplamente explorado industrialmente (LACROIX *et al.*, 1999). Fungos filamentosos também são capazes de transformar monoterpenos (MIYAZAWA *et al.*, 1997), diterpenos (HANSON, 1992) e triterpenos pentacíclicos (KOUZI *et al.*, 2000; COLLINS *et al.*, 2002), além de alcaloides (CHATTERJEE *et al.*, 2000).

A abordagem tradicional para inclusão de biotransformações em um processo sintético normalmente inicia-se com a escolha do microrganismo utilizado. Essa pode ser a etapa mais crítica do procedimento global. Inicialmente, analisam-se os resultados semelhantes já disponíveis na literatura em relação à reação de interesse, na tentativa de se obter dados no que diz respeito às possíveis enzimas envolvidas no processo; obtêm-se as cepas com outros grupos de pesquisa ou em coleções de culturas de instituições de pesquisa. Na ausência de dados na literatura que indiquem o sistema enzimático desejado à reação em estudo, pode-se isolar o microrganismo da natureza (solo, plantas, ambientes marinhos) e testá-lo através de um processo empírico de seleção (*screening*). Nesse tipo de seleção realizam-se experimentos em pequena escala com os organismos disponíveis e analisam-se os extratos brutos obtidos do caldo de fermentação, comparando-se a um controle, o qual não foi adicionado substrato. Se houver a formação de novos metabólitos isso significa que aquele organismo realizou alguma transformação química no substrato (GLAZER e NIKALDO, 1995).

Fármacos biotransformados podem originar metabólitos ativos cujos efeitos farmacológicos sejam superiores aos de seu precursor ou até que podem desencadear reações tóxicas. Na maioria das vezes, a ação farmacológica que é atribuída aos metabólitos ativos é similar àquela apresentada pela substância precursora. Existem casos em que os metabólitos ativos podem ser alvos de modificações estruturais, com a finalidade de aperfeiçoar suas ações farmacológicas e convertê-los em novos medicamentos (FURA, 2006; BARREIRO e FRAGA, 2008).

## 1.3 LEISHMANIOSE

### 1.3.1 Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças ocasionadas por um amplo espectro de vetores, possuindo grande diversidade clínica e epidemiológica. É ocasionada por mais de vinte espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae*. É uma zoonose comum ao cão e ao homem, sendo transmitida aos humanos através da picada de mosquitos flebotômídeos implicados na disseminação desta doença (BANULS *et al.*, 2007) que compreendem em particular os gêneros *Lutzomia* (Velho Mundo) e *Phlebotomus* (Novo Mundo).

Os agentes causadores de leishmanioses humanas são protozoários pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, à superclasse Mastigophora, à ordem Kinoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*.

A classificação desse gênero foi, inicialmente, baseada em vários critérios extrínsecos como as características clínicas, geográficas e biológicas. No entanto, as análises moleculares e bioquímicas mostraram que o critério patológico e geográfico era inadequado e outros critérios, como o padrão do polimorfismo mostrado pelos marcadores do DNA do cinetoplasto (kDNA), proteínas ou antígenos, poderiam ser usados para melhor classificação do gênero. Desta maneira, desde 1970, critérios bioquímicos, imunológicos e genéticos têm sido usados para classificar as espécies de *Leishmania* (BANULS *et al.*, 2007), que podem ser subdivididas em dois subgêneros: *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)*, as quais diferem principalmente no sítio de desenvolvimento do parasito dentro dos insetos vetores (MISHRA *et al.*, 2009b; SIQUEIRA, 2011). Enquanto as espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior, denominado secção peripilária, as do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio, denominado secção suprapilária (LAISON e SHAW, 1998).

O gênero *Leishmania* é formado por mais de trinta espécies, das quais vinte são patogênicas para os humanos (BANULS *et al.*, 2007; NEUBER, 2008).



Atualmente, são reconhecidas no Brasil sete espécies dermatrópicas de leishmanias causadoras de doença humana, sendo as principais a *L. (L.) amazonensis*, a *L. (V.) guyanensis*, a *L. (V.) braziliensis*, a *L. (V.) lainsoni*, a *L. (V.) naiffi*, a *L. (V.) lindenberg* e a *L. (V.) shawi* (LAISON e SHAW, 1998; SAÚDE, 2013; PORTAL DA SAÚDE, 2016).

As principais espécies responsáveis por desencadear leishmaniose cutânea no velho mundo são: *Leishmania tropica*, *L. aethiopica*, *L. major* e *L. infantum*. No novo mundo são comuns casos de leishmaniose cutânea transmitidos por: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) venezuelensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) naiffi* e *Leishmania (V.) lainsoni*, esses casos são designados de leishmaniose cutânea do novo mundo ou americana (LCA). Enquanto no velho mundo a maioria das espécies de leishmania causa doença cutânea benigna, as espécies do novo mundo desencadeiam um amplo espectro da doença variando de doença cutânea leve até lesões graves atingindo as mucosas, isso depende de muitos parâmetros, incluindo o estado imunológico do hospedeiro e a infectividade da espécie (MALTEZOU, 2010).

### 1.3.2 Ciclo biológico do parasito

O ciclo de vida das *leishmanias* (Figura 1) consiste na fase móvel, flagelada, extracelular, chamada de promastigota, que se encontra no intestino do mosquito flebotômideo e infecta mamíferos; neles se transforma na fase não flagelada e imóvel do parasito, denominada amastigota, e que sobrevive e se multiplica em células fagocitárias de mamíferos, especialmente os macrófagos.

A transmissão da leishmaniose é feita pela fêmea do flebotômideo infectado, a qual, durante o repasto sanguíneo, regurgita formas infectantes (promastigotas) no hospedeiro vertebrado pela sua probóscide (aparelho bucal do inseto). As formas promastigotas são englobadas por células do sistema mononuclear fagocítico, transformando-se em amastigotas intracelulares. Estas formas disseminam-se pelo sistema linforreticular do fígado, baço e endotélio vascular, onde se multiplicam intensamente por divisão binária até romper a

células infectadas, tornando a infectar novas células. A fêmea do flebotomídeo, ao realizar novo repasto sanguíneo, provoca uma pequena laceração na pele e um hematoma, do qual ingere macrófagos infectados com amastigotas. Estes se transformam em promastigotas no intestino médio do inseto, onde sofrem divisão e migram para probóscide, infectando novos hospedeiros (COURA, 2008; NEVES, 2010; CDC, 2015).

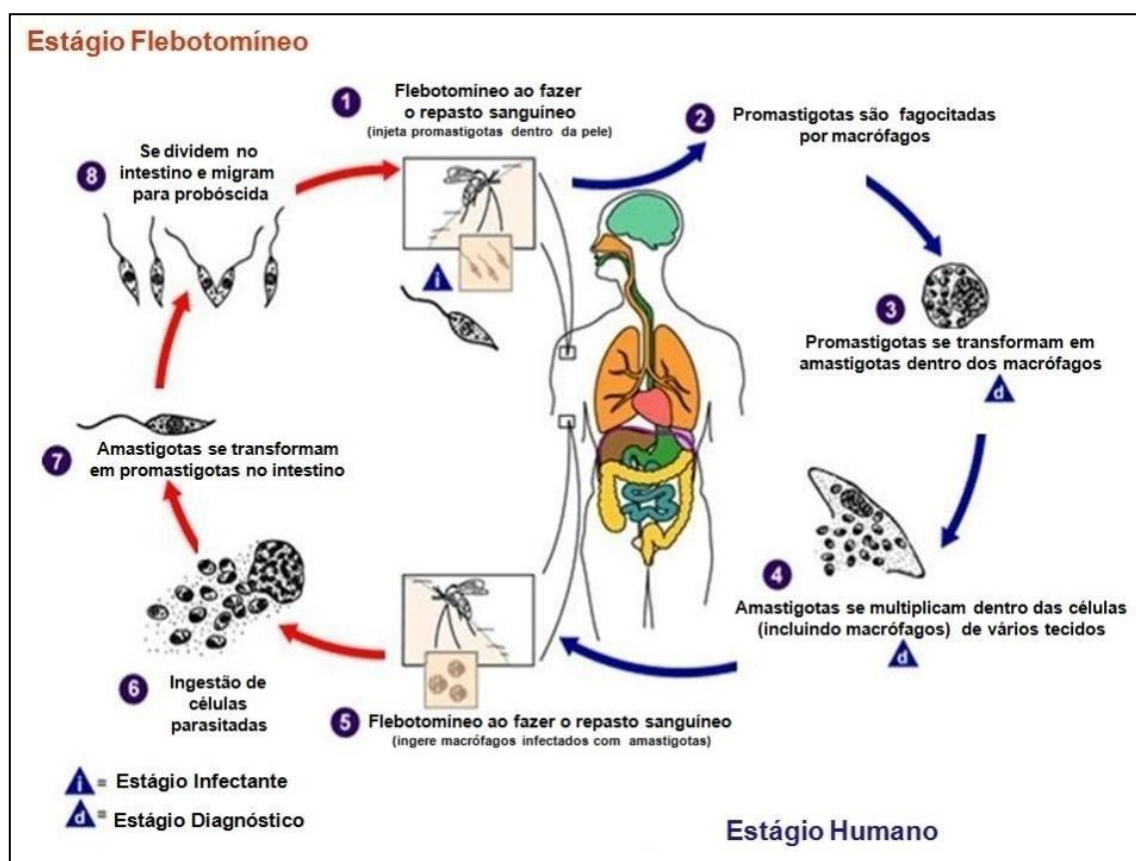


FIGURA 1: CICLO DE VIDA DAS LEISHMANIAS

FONTE: CDC, 2015 (ADAPTADO)

NOTA: As leishmanias são transmitidas por mosquitos flebotomídeos fêmeas que injetam a forma promastigota na pele de animais selvagens ou humanos. Dentro dos vertebrados os parasitos são fagocitados por macrófagos e se diferenciam na forma amastigota

### 1.3.3 Morfologia

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários unicelulares, que possuem um ciclo de vida heteroxênico (digenético), ou seja, que se desenvolvem em dois hospedeiros diferentes e, como já visto, se apresentam sob duas formas de desenvolvimento: a forma promastigota, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, e a forma amastigota, parasito

intracelular encontrado no hospedeiro vertebrado (BANULS *et al.*, 2007; ALCOLEA *et al.*, 2010). Essas formas adaptativas representam uma estratégia adotada pelos parasitos para sobreviver às mudanças nas condições ambientais encontradas em seus hospedeiros, como variações na disponibilidade e tipos de nutrientes, pH, temperatura e oxigênio. Porém, diferem em seus requerimentos nutricionais, taxa de crescimento, habilidade em se dividir, na expressão regulada de suas moléculas de superfície e na sua morfologia (BESTEIRO *et al.*, 2007).

As formas amastigotas são células que podem apresentar formato ovalado, esférico ou fusiforme, com diâmetro variando de 3,0-6,5 x 1,5-3,0  $\mu\text{m}$  (comprimento x largura), as quais se localizam em vacúolos no interior dos macrófagos do hospedeiro infectado, onde se multiplicam por divisão binária (Figura 2 A). Não há flagelo livre, mas somente um rudimento que é encontrado no interior da bolsa flagelar. O citoplasma contém todas as organelas membranosas e estruturas tipicamente presentes nas células eucarióticas como núcleo grande, esférico ou ovóide, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndria e ribossomos, podendo, ainda, serem encontrados vacúolos e inclusões citoplasmáticas. Nestes parasitos, as mitocôndrias apresentam uma diferença marcante na forma de organizar seu material genético. O DNA mitocondrial está condensado e empacotado na forma de círculos concatenados denominados de maxicírculos e minicírculos. Este material compactado ocupa uma posição definida dentro da célula do parasito, ficando logo abaixo da bolsa flagelar, região denominada de cinetoplasto (MICHALICK e RIBEIRO, 2011; HATAM *et al.*, 2013).

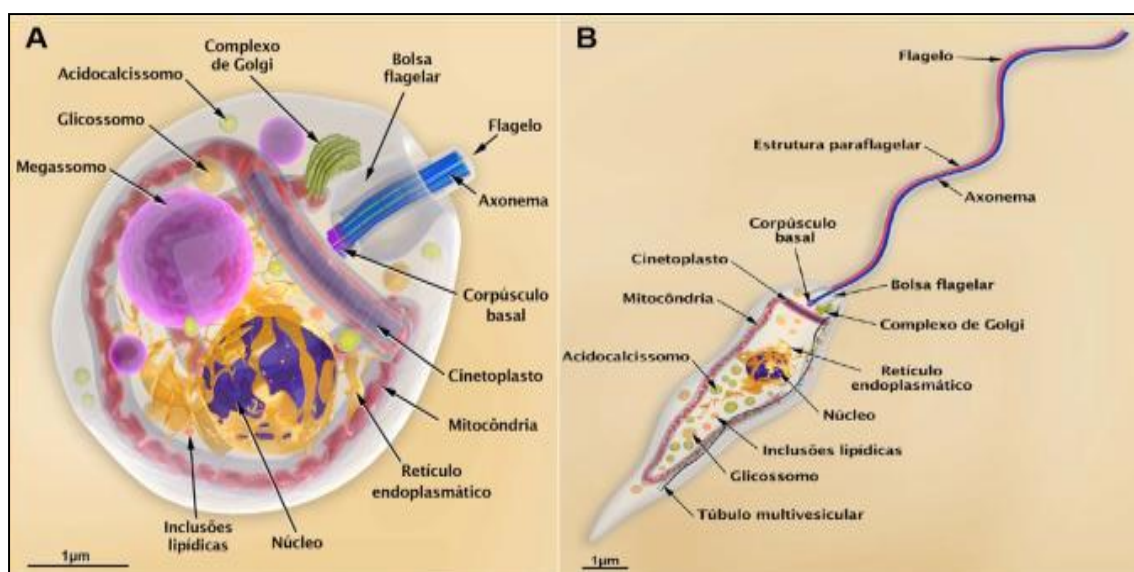


FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO DAS FORMAS ADAPTATIVAS DE *L. (L.) amazonensis*  
 FONTE: TEIXEIRA *et al.*, 2013 (ADAPTADO)  
 NOTA: A figura demonstra as principais organelas celulares. Amastigota (a) e Promastigota (b)

As formas promastigotas são extracelulares, móveis e alongadas, medindo entre 16,0-40,0 x 1,5-3,0 µm (comprimento x largura) e apresentando núcleo único, com formato arredondado ou oval (Figura 2B). O cinetoplasto é anterior ao núcleo e o flagelo longo torna-se livre a partir da porção anterior da célula. No intestino do inseto, essas formas multiplicam-se por divisão binária longitudinal. No inseto vetor duas formas promastigotas podem ser encontradas: as formas multiplicativas, mas não infectivas aos mamíferos, que são denominadas de promastigotas procíclicas, e as formas não multiplicativas, capazes de infectar mamíferos, denominadas de promastigotas metacíclicas, que são encontradas na parte anterior do intestino e na probóscide dos flebotomídeos. As promastigotas metacíclicas possuem diâmetro do corpo menor em relação às promastigotas procíclicas e flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo (MICHALICK e RIBEIRO, 2011).

Protozoários tripanossomatídeos, como as leishmanias, apresentam estruturas comuns às demais células eucariotas, como retículo endoplasmático liso e rugoso, aparato de Golgi, mitocôndria e microtúbulos. Apesar dos aspectos comuns, estes protozoários apresentam diferenças que podem ser exploradas como possíveis alvos terapêuticos. Os tripanossomatídeos possuem, também, outras organelas que lhe são peculiares, como os

glicossomas, megassomos e acidocalcissomos. Estudos mostraram que nestas organelas existem vias metabólicas únicas e vitais para interação parasito-hospedeiro e que podem ser utilizadas como alvos terapêuticos (DE SOUZA, 2008).

DA SILVA e colaboradores (2012) demonstraram que a compartimentalização adequada da arginase no glicossoma da *L. amazonensis* é importante para a atividade e para possibilitar que o parasito infecte o hospedeiro. Outro exemplo são os microtúbulos, pois nestes parasitos estas estruturas estão organizadas logo abaixo da membrana celular formando um arcabouço que se associa a membrana plasmática sendo denominados de microtúbulos subpeculiares. Desta forma, diferentes fármacos com atividades antitumorais, antifúngicas e anti-helmínticas que interferem com a dinâmica dos microtúbulos poderiam ser testados quanto a sua eficácia contra os microtúbulos das leishmanias (JAYANARAYAN E DEY, 2002).

#### 1.3.4 Formas clínicas da leishmaniose

Nas leishmanioses a porta de entrada é sempre a mesma, o macrófago tecidual é o alvo, a inflamação e a imunidade ativada por macrófagos regulam a expressão da doença e a persistência do parasito é regra apesar da cura espontânea ou induzida por tratamento (MURRAY *et al.*, 2005).

Mundialmente as leishmanioses são tradicionalmente divididas em duas formas clínicas: Leishmaniose visceral (LV) e Leishmaniose cutânea (LC), que diferem na imunopatologia e no grau de morbidade e mortalidade da doença. A maioria das leishmanioses viscerais (LV) causadas pelo *L. donovani* são fatais se não tratadas; já as leishmanioses cutâneas (LC), que frequentemente são causadas por *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. panamensis*, progridem para cura dentro de 3-18 meses, porém podem normalmente deixar cicatrizes desfigurantes (MISHRA *et al.*, 2009a).

A evolução da doença depende da natureza da resposta imune do hospedeiro, bem como de fatores intrínsecos ao parasito expressos, em geral, de maneira distinta entre as espécies de leishmanias. A infecção apresenta uma evolução crônica, podendo se manifestar com lesões cutâneas localizadas

ou disseminadas, ou comprometer outros tecidos e órgãos, como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, na forma mais grave e fatal que é denominada de Calazar. As variadas formas clínicas se diferem pelas propriedades do parasito, envolvendo temperatura, tropismo tecidual, capacidade de imunoevasão e persistência.

As manifestações clínicas de LCA incluem leishmaniose cutânea aguda/localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), também conhecida como leishmaniose cutânea disseminada ou leishmaniose mucocutânea (LM). No meio deste amplo espectro clínico a LCD é a forma mais comum de LC. Sempre que a infecção por leishmania não é controlada (por tratamento inadequado, falta de comprometimento do paciente com o tratamento ou por estado de imunossupressão, por exemplo) a doença pode evoluir para LCD ou LM, ainda existe um outro caso mais grave da doença que é a leishmaniose cutânea disseminada limítrofe (LCDL), que semelhante a LCD pode ocasionar uma evolução crônica, maior tendência para recaída e resistência parcial a terapia medicamentosa padrão utilizada (SILVEIRA *et al*, 2004; PANIZ *et al*, 2013).

A leishmaniose visceral (LV), causada principalmente por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, é a forma sistêmica da doença, caracterizada por febre irregular, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. Atinge o fígado, baço, medula óssea e linfonodos, em decorrência do viscerotropismo do parasito. Esta forma da doença pode levar à morte caso não seja tratada (MURRAY, 2005).

A leishmaniose dérmica pós-Calazar é uma manifestação cutânea da leishmaniose visceral, caracterizada por lesões na pele, nódulos e pápulas, frequentemente na face. Esta forma pode aparecer de 2 a 7 anos após o tratamento com os antimoniais pentavalentes, sendo extremamente difícil de tratar. Os primeiros casos relatados foram a partir da LV causada por *L. donovani* na Índia e Sudão, mas já existem alguns casos relatados após infecção por *L. infantum* e *L. chagasi* (CROFT, 2008).

Mais de 90% dos casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil; 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita e Siria (DESJEUX, 2004). Entretanto, esses

números refletem somente os casos relatados; existem vários casos, principalmente nas áreas endêmicas, que não são notificados, mascarando a real severidade da doença (SINGH, 2006).

A leishmaniose é uma doença de grande impacto social uma vez que a patologia desta enfermidade está associada às deformidades e cicatrizes desfigurantes causadas por algumas espécies, bem como incapacidades relacionadas à doença, impondo grande carga social, obstruindo a produtividade e o desenvolvimento sócio-econômico do país (DESJEUX, 2004).

#### **1.4 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

A ocorrência de lesão tecidual causada por cirurgias, agentes infecciosos, queimaduras, traumas, infarto do tecido, câncer, dentre outras causas, induz uma complexa sequência de eventos conhecida como resposta inflamatória (ISOBE *et al.*, 2012). O processo inflamatório elimina o agente nocivo e desencadeia eventos que podem curar e reconstituir o tecido lesado (FIALKOW *et al.*, 2007).

No decorrer da resposta inflamatória observa-se duas reações principais: a vascular e a celular. Essas reações são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas que são produzidos e ativados pelo estímulo inflamatório. A liberação destes mediadores quimiotáticos leva os leucócitos a uma sequência de eventos (Figura 3): a) no lúmen do vaso sanguíneo ocorre a marginalização, seguida de rolamento e da adesão ao endotélio; b) transmigração através do endotélio e c) migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (LAWRENCE e GILROY, 2007; GRIFFIN *et al.*, 2012; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

A resposta é geralmente rápida e similar quando o estímulo é de natureza química, física, microbiológica ou imunológica, sendo caracterizada por inchaço e vermelhidão (ou eritema) como resultado de uma transferência de plasma e proteínas do sangue para espaços intersticiais, comumente acompanhados por aumento do fluxo sanguíneo local (hiperemia). Estas são as primeiras reações visíveis, que podem estar seguidas de deposição

plaquetária, marginalização dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos capilares sanguíneos e subsequente infiltração para os tecidos. Nos estágios mais avançados da inflamação, quando não há eliminação ou supressão do agente causador, o processo torna-se crônico e ocorre, também, a infiltração de leucócitos mononucleares (MNC), representados por linfócitos e monócitos (COTRAN *et al.*, 1994).

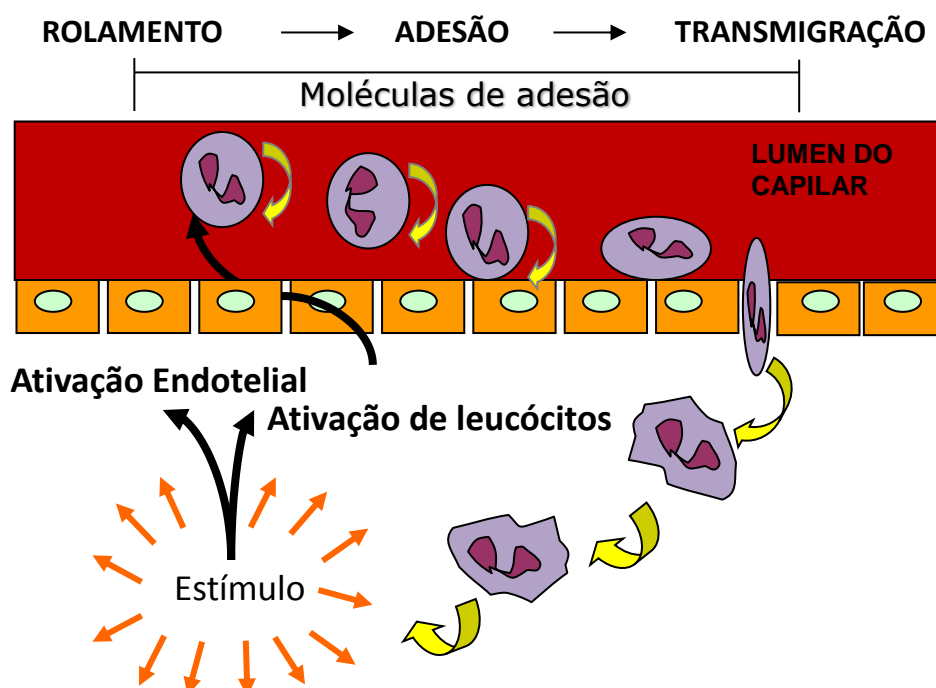


FIGURA 3- EVENTOS LEUCOCITÁRIOS NA INFLAMAÇÃO

NOTA: Durante o processo inflamatório, os leucócitos são atraídos para a área da lesão por meio de citocinas pró-inflamatórias liberadas localmente. Primeiramente, rolam e aderem-se transitoriamente ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese; em seguida, migram em direção ao local da lesão, onde exercem suas atividades de eliminação do agente causal e cooperam na reparação do tecido lesado

#### 1.4.1 Quimiotaxia

Além da função adesiva, os leucócitos têm atividade quimiotática. A quimiotaxia, ou o movimento celular direcional a favor (quimiotaxia positiva) ou contra (quimiotaxia negativa) um gradiente químico, é comum a várias células eucarióticas e, no caso particular dos leucócitos, é o mecanismo pelo qual essas células se acumulam no sítio inflamatório (WILKINSON, 1996).



Os atratores químicos são, em geral, moléculas pequenas e solúveis que reconhecem e se ligam a receptores transmembrânicos específicos, via proteína G, localizados na superfície dos leucócitos. O sinal quimiotático liberado dessa interação é o AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), mensageiro intermediário que ativa vias específicas com consequente aumento da polimerização de actina, produzindo filamentos ramificados (F-actina) na linha de frente, em direção ao sinal. Esta polimerização localizada empurra a membrana celular para frente, acompanhada de contração do pólo posterior, a qual é mediada pela proteína motora miosina II (CHUNG *et al.*, 2001). Na sua forma molecular monomérica, a actina é solúvel, mas quando polimerizada produz filamentos insolúveis de considerável força mecânica. As miosinas interagem com filamentos de actina e convertem a energia química do ATP (adenosina trifosfato) em trabalho mecânico, resultando na tração e movimento celular.

Portanto, como resultado da ativação de receptores quimioatratores, os neutrófilos são estimulados a mover-se, rearranjar seu citoesqueleto e, por fim, fagocitar microrganismos. Além disso, frequentemente ocorre degranulação e ativação da NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) oxidase, gerando metabólitos tóxicos do oxigênio (BOKOCH, 1995).

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia, denominadas quimioatratoras, não constituem uma classe específica de substâncias e podem ter natureza exógena ou endógena. Dentre as substâncias exógenas que provocam alterações no comportamento locomotor dos leucócitos encontram-se alguns produtos de bactérias, como os peptídeos *N*-formilados (*f*-MLP) (RABGAOUI *et al.*, 1994; QU *et al.*, 1995; JOHANSSON *et al.*, 2002); certos agentes como a caseína (WILKINSON, 1974; LEWIS e VAN EPPS, 1983; WILKINSON, 1988; RABGAOUI *et al.*, 1994; SIDDIQUI *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2001), alguns derivados de bactérias como os lipopolissacarídeos (LPS) (QU *et al.*, 1995) e proteínas desnaturadas (WILKINSON, 1988). Dentre as substâncias endógenas, as mais conhecidas são as citocinas, que, de modo geral, são capazes de estimular todos os tipos de leucócitos do sangue. Destas, destacam-se a IL-8, o TNF- $\alpha$ , o interferon gama, além de componentes do sistema complemento, como as frações C3a e C5a, os produtos

relacionados à lipoxigenação do ácido araquidônico (leucotrienos), particularmente o LTB<sub>4</sub>, e o fator de ativação plaquetário (PAF) (LEWIS e VAN EPPS, 1983; WILKINSON e HASTON, 1988; COTRAN *et al.*, 1994; BOKOCH, 1995; SIDDIQUI *et al.*, 1999; JOHANSSON *et al.*, 2002).

#### 1.4.2 A resposta imune

A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções disseminadas, habitualmente associadas com alto índice de mortalidade.

O local da infecção e o tipo de patógeno são fatores determinantes do tipo de resposta imunológica que será desencadeada. A resposta imunológica adaptativa desenvolve-se após o contato entre as células do sistema e um patógeno como, por exemplo, vírus, bactérias, ou protozoários, o que lhe confere caráter de especificidade (ROITT *et al.*, 2003). Estas células são capazes de identificar e reagir somente com as moléculas que são estranhas ao organismo. Outro fator que colabora para a ativação do sistema imunológico adaptativo é o fato da agressão pelo agente ser reincidente, pois uma característica específica deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (PARHAM, 2001).

Devido às suas importantes características de memória, especificidade e reconhecimento do não próprio, o sistema imunológico adaptativo é mais rápido e eficaz na defesa do organismo. Os tipos celulares que medeiam esta reação são os linfócitos, em particular os B e T, e as células apresentadoras de antígenos (APC), representadas por uma coleção de monócitos, macrófagos e células dendríticas (ROITT *et al.*, 2003).

Existem, além das barreiras naturais, respostas imunes inespecíficas que se desenvolvem para combater qualquer invasor que se atreva a penetrar nas barreiras naturais e infectar o organismo. A resposta inespecífica significa aquela resposta em que não há um combate contra um epítopo, mas sim contra um antígeno que estiver no local, não sendo ele específico, mas qualquer substância estranha que esteja em contato com ele (como uma célula

envolvida por imunoglobulina ou célula tumoral). Neste tipo de resposta estão presentes as células como os macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, células NK e o sistema complemento.

O modo pelo qual um antígeno é reconhecido pelos receptores presentes na superfície de linfócitos T e B são específicos e isso reflete as diferentes funções dessas células após sua ativação pelo antígeno.

Um linfócito B ativado pode transformar-se num plasmócito produtor de imunoglobulinas específicas ao antígeno, inicialmente apresentado. A função desses anticorpos é ligar-se diretamente ao antígeno que lhe deu origem, com a finalidade de neutralizar sua atividade ou de desencadear mecanismos de defesa que culminem na sua eliminação. Na prática, isso significa que células B podem interagir com o antígeno na sua forma nativa, sem modificações (BROSTOFF e MALE, 1994; REEVES e TODD, 2000).

Já os linfócitos T regulam a atividade das outras células do sistema imunológico ou eliminam as células infectadas. Portanto, interações com outros tipos celulares são necessárias para que as células T possam desempenhar sua função.

A ativação e o desempenho de funções pelos linfócitos T e B requerem sua interação, assim como com outros tipos celulares. As oportunidades para que esses contatos ocorram são maximizadas pela recirculação dos linfócitos através de todo o organismo e pela sua manutenção nos órgãos linfóides secundários, levando ao desenvolvimento do vasto repertório imunológico observado em indivíduos normais (REEVES e TODD, 2000).

Os eventos celulares que decorrem da ativação de um linfócito são denominados coletivamente de transformação blástica e as células resultantes deste processo são referidas como células efetoras da resposta imunológica. Morfologicamente, são caracterizados como linfoblastos e possuem elevada capacidade proliferativa. Como resultado, observa-se um aumento do número de células, da produção e secreção de citocinas, assim como de expressão de receptores específicos.

As células efetoras, originadas da ativação de linfócitos T CD4, proliferam dando origem a células auxiliares, responsáveis pela propagação da

resposta imunológica por meio da produção e secreção de mediadores químicos.

A população de células TCD4<sup>+</sup> (T helper) é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: as células Th1 e Th2. Essa observação tem contribuído bastante para o entendimento da imunopatogênese da maioria das doenças infecciosas. É fundamental o entendimento de que tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- $\gamma$  modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (MILLS e MCGUIRK, 2004).

A imunidade mediada por células T desempenha um importante papel na resposta imunológica à infecção por *Leishmania*. A resposta de células T helper tipo 1 (Th1) predominantemente está relacionado com a cura, enquanto uma predominância da resposta Th2 ou a falta de uma resposta Th1 adequada está relacionada ao agravamento da doença ou a falha no tratamento. Pacientes com LCL predominantemente desenvolvem uma resposta Th1 com produção de citocinas (principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Já pacientes com LCD normalmente apresentam uma resposta do tipo Th2, com produção de citocinas relacionadas com Th2 (principalmente IL-4 e IL-10). Em contraste, como seria de esperar, no subconjunto de LCDL existe um perfil de citocinas misto, com uma resposta Th1 baixa, porém existente (SILVEIRA *et al*, 2004).

No caso de linfócitos B, após transformação, muitos proliferam dando origem aos plasmócitos, células efetoras especializadas na síntese de imunoglobulinas que são, então, secretadas como anticorpos livres.

Outros linfoblastos formam uma população de memória específica para o antígeno que induziu a resposta primária, readquirindo o aspecto morfológico do linfócito inicial. São essas células que, quando re-expostas ao mesmo antígeno ou a outro cuja estrutura antigênica seja muito semelhante, produzem

uma rápida e vigorosa resposta imunológica, chamada secundária (REEVES e TODD, 2000).

A ativação de linfócitos decorre da interação entre um antígeno e o receptor presente na superfície celular com o qual ele pode interagir. Em células CD4, por exemplo, este evento culmina com a proliferação, diferenciação e produção de citocinas que medeiam as funções específicas de células T efectoras, como já citado. Eventos subsequentes, que ocorrem em segundos ou minutos após a interação ligante-receptor, incluem mudanças no fluxo de cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e a ativação de metiltransferases. Ao mesmo tempo, síntese e utilização de fosfolipídeos aumentam, envolvendo fosfatidilinositol, um constituinte dos fosfolipídeos de membrana. Influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é central na ativação de linfócitos e ocorre em poucos minutos após interação do mitógeno fitohemaglutinina, por exemplo, com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos. Após algumas horas dessa interação ligante-receptor, a síntese de proteínas aumenta, alcançando um pico entre 48 e 72 h. Neste período, ocorre aumento da síntese de RNA, assim como há síntese de várias proteínas (COOPER, 1972). O conteúdo de RNA em linfócitos dobra em 48 h e reflete-se em alterações morfológicas distintas da célula. Finalmente, aumento da síntese de DNA, a marca registrada da proliferação celular, inicia-se após cerca de 36 h, atingindo níveis máximos entre 48 e 72 h (GREAVES e JANOSSY, 1972).

Certas substâncias possuem a habilidade de ativar e, subsequentemente, induzir a proliferação de linfócitos T, B ou de ambos *in vitro*, sendo genericamente denominados mitógenos (GERY e WAKSMAN, 1972; JANNOSSY e GREAVES, 1972; OPPENHEIM e ROSENSTREICH, 1976).

Enquanto a resposta a antígenos dos linfócitos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal, sua resposta a mitógenos *in vitro* é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blástica e, posteriormente, proliferar.

Diferente do que acontece *in vivo*, esse estímulo à proliferação não depende de células apresentadoras de antígenos (BURGERMEISTER *et al.*, 2003). Esta propriedade favorece estudos experimentais e fito-hemaglutinina (PHA) e Concanavalina A (Con A), lectinas extraídas e purificadas de plantas

que estimulam sub-populações de células T, têm sido usadas como mitógenos para estudos de proliferação dessas populações *in vitro* e a resposta resultante pode ser utilizada para qualificar e quantificar a imunocompetência dessas células (MYERS, 1995).

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, têm sido acumuladas nos últimos anos evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exagerada e não modulada que tem como consequência dano tecidual (COOKE *et al*, 2004).

#### 1.4.3 Adesão celular

As moléculas de adesão são glicoproteínas expressas na superfície celular que medeiam o contato entre duas células ou entre a célula e a matriz extracelular (MEC). O processo de adesão é essencial e ocorre em vários eventos biológicos tais como: morfogênese, crescimento, organização e estabilidade teciduais, inflamação, resposta do hospedeiro às infecções e injúria, cicatrização e resposta imunocelular. As moléculas de adesão são responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação. Atuam, ainda, como moléculas sinalizadoras, tendo participação essencial na regulação da inflamação e da resposta imunitária (SIMMONS, 1995).

As moléculas de adesão apresentam-se divididas, conforme a similaridade estrutural e funcional, em cinco grupos: caderinas, mucinas, família das selectinas, família das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (ALBERTS *et al*, 2002; SIMON e GREEN, 2005).

Na superfamília das imunoglobulinas estão incluídas, dentre outras, as moléculas expressas no endotélio vascular, importantes na interação leucócito-endotélio, como a VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule - 1*) e a ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule - 1*) (SIMMONS, 1995).

A ICAM-1 é constitutivamente expressa no epitélio e, em baixos níveis, nas células endoteliais, tendo sua transcrição regulada por várias citocinas. Possui dois sítios de ligação para a integrina  $\beta_1$ , também conhecida como CD11a e LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen - 1*). A VCAM-1 tem níveis de expressão basal muito baixos nas células endoteliais, porém esses níveis aumentam sob ação de citocinas como a IL-4. Sua fixação maior ocorre através do ligante VLA-4 (*Very Late Activation Antigen - 4*) (CARLOS e HARLAN, 1994, GAHMBERG *et al.*, 1999). Enquanto, ICAM-1 está envolvida no recrutamento de todos os tipos de leucócitos, VCAM-1 mobiliza células mediadoras da inflamação crônica como linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (SPRINGER, 1994).

As moléculas de adesão pertencentes à família das selectinas são expressas em células endoteliais (E-selectina), plaquetas (P-selectina) e leucócitos (L-selectina) e medeiam os processos envolvidos no rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso (LAWRENCE e SPRINGER, 1991), enquanto as MA da família das integrinas promovem a adesão transitória dessas células ao endotélio (SPRINGER, 1990).

#### 1.4.3.1 Integrinas

As integrinas compreendem um amplo grupo de moléculas heterodiméricas constituídas por duas subunidades polipeptídicas transmembrana denominadas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (HYNES, 2002). A família se subdivide em diversas subfamílias dependendo da cadeia  $\beta$  que a constitui (HYNES, 2002; SIMON e GREEN, 2005). Ao todo 24 heterodímeros de integrinas, formados por 8 tipos de cadeia  $\beta$  e 18 tipos de cadeia  $\alpha$ , já foram identificados (SIMMONS, 1995; SIMON e GREEN, 2005; HYNES, 2002). Todas as integrinas possuem natureza glicoprotéica e cada uma com um segmento extracelular transmembrânico hidrofóbico único (HYNES, 1992), e uma pequena porção citoplasmática. Enquanto o domínio extracelular interage com uma série de ligantes, incluindo proteínas da matriz extracelular (MEC), como fibronectina, vitronectina, colágeno e outros receptores celulares como

as ICAM-1 e VCAM-1 (BURRIDGE *et al.*, 1988; ARNAOUT, 1990; SPRINGER, 1990), a porção citoplasmática interage com as proteínas do citoesqueleto celular (MEREDITH *et al.*, 1996).

Como regra geral, as integrinas que contém a subunidade  $\beta_1$  medeiam interações com componentes da MEC (BUCK e HORWITZ, 1987; AKIYAMA *et al.*, 1990), enquanto as  $\beta_2$ , expressas unicamente nos leucócitos juntamente com três unidades  $\alpha$ , também específicas para leucócitos, medeiam interações intercelulares (WRIGHT e DETMERS, 1988).

Deve-se ressaltar que cada receptor  $\alpha\beta$  reconhece um ou mais ligantes e a especificidade de ligação de um determinado receptor pode ser marcadamente comprometida pelo ambiente em que ele se encontra ou pelo seu estado de ativação. Dessa forma, a expressão de uma integrina não necessariamente indica que ela terá um papel funcional na adesão, até mesmo se o seu ligante estiver presente em um contexto disponível. Muitas vezes, elas precisam ser primeiro ativadas por mediadores solúveis, como hormônios e particularmente citocinas, por exemplo, ou por proteínas componentes da MEC (SPRINGER, 1990; HYNES, 1992; LAMPUGNANI e DEJANA, 1997) para, então, aumentar sua afinidade e interagir com o ligante.

As integrinas  $\beta_2$  são estruturas heterodímeras que contém uma cadeia alfa variável (CD11a, CD11b ou CD11c) e uma cadeia beta comum (CD18) (ARNAOUT, 1990). A molécula LFA-1 (ou CD11a ou  $\alpha_L\beta_2$ ) é uma integrina  $\beta_2$  expressa em todos os leucócitos (HYNES, 2002; KIPPS, 2001), sendo constitutivamente ativa em diferentes células (LARSON *et al.*, 1991). Esta integrina não se adere normalmente ao seu ligante ICAM-1, presente no endotélio vascular (HYNES, 2002). Entretanto, quando os granulócitos são ativados por diferentes fatores, em particular os que estimulam sua migração, como a IL-8 (BEN-BARUCH *et al.*, 1995), LFA-1 é convertida de um estado de baixa afinidade para uma situação de alta afinidade para com ICAM-1, com mudança conformacional da molécula (HYNES, 1992).

Durante uma inflamação, por exemplo, o aumento da afinidade de LFA-1 simultaneamente ao aumento da expressão de ICAM-1 pelo endotélio induzido por citocinas, propicia-lhes uma forte ligação. Esta interação, juntamente com a diminuição do fluxo sanguíneo local, permite uma firme adesão dessas células



ao endotélio, facilitando processos subsequentes como, por exemplo, a transmigração celular e a quimiotaxia (HYNES, 1992).

Integrinas  $\beta_1$  são encontradas primariamente em leucócitos presentes na inflamação crônica e seus níveis aumentam após estímulo antigênico. Assim como em outros tipos de células, as integrinas  $\beta_1$  medeiam adesão de linfócitos às proteínas da matriz extracelular e parecem desempenhar função relevante no extravasamento e migração dessas células ativadas nos tecidos durante a resposta imunitária (FERGUSON *et al.*, 1991).

Dentre as integrinas  $\beta_1$ , destacam-se as moléculas VLA (*Very Late Activation antigens*), cuja terminologia está relacionada a um grupo de moléculas, cujos níveis de expressão elevam-se em linfócitos somente 14-21 dias após sua ativação (CLARK *et al.*, 1992). Ocorrem em, pelo menos, seis diferentes isoformas, denominadas VLA-1 a VLA-6.

Dentre elas, o VLA-4, também conhecido sob as denominações  $\alpha_4\beta_1$  e CD49d/CD29, é uma integrina  $\beta_1$  que atua como receptor celular (SPRINGER, 1994) ligando-se, via EILDV, à VCAM-1 (SHIMIZU *et al.*, 1990a) e, como receptor de matriz, liga-se ao mesmo epítipo presente na molécula de FN. Da mesma forma, VLA-5, denominado também de  $\alpha_5\beta_1$  e CD49e, interage com a FN usando o sítio RGD.

Observou-se que a ativação aguda de células que medeiam as respostas inflamatória e imunitária resulta em uma rápida indução da sua adesão à fibronectina, porém sem alteração dos níveis de expressão de VLA-4 e VLA-5 (SHIMIZU *et al.*, 1990b).

Em adição ao seu papel como receptores da adesão, as integrinas também atuam como sinalizadores para outros receptores e parecem estar envolvidos com a regulação do reconhecimento do citoesqueleto, transporte iônico, metabolismo de lipídios, ativação de proteínas quinase e expressão gênica (MEREDITH *et al.*, 1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Obter derivados da 2-fenilquinolina (I) e da 2-*n*-pentilquinolina (II) através do processo de biotransformação e investigar suas atividades leishmanicida e anti-inflamatória.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Submeter a 2-fenilquinolina e 2-*n*-pentilquinolina ao processo de biotransformação com microrganismos selecionados;
- ❖ Avaliar o potencial biológico dos derivados obtidos em ensaios preliminares contra formas promastigostas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- ❖ Verificar os efeitos dos derivados sobre a quimiotaxia espontânea de granulócitos e naquela induzida por caseína;
- ❖ Avaliar o potencial imunomodulatório dos derivados sobre a transformação blástica e proliferação de linfócitos humanos, espontânea e estimulada por fito-hemaglutinina;
- ❖ Avaliar a expressão de LFA-1, VLA-4, VLA-5 em linfócitos, monócitos e granulócitos de indivíduos sadios após o tratamento com as substâncias estudadas;
- ❖ Avaliar a migração celular de fibroblastos através do ensaio de *scratch*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedimentos gerais

##### 3.1.1 Instrumentação

A estrutura das substâncias foi determinada por meio de técnicas espectroscópicas. Para análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram utilizados equipamentos Brucker Advance DPX-200 (para RMN<sup>1</sup>H, 200 MHz; e RMN<sup>13</sup>C e DEPT 135, 50 MHz) e Brucker Advance DRX-400 (para COSY, HSQC e HMBC), localizados no Departamento de Química da UFPR e Brucker Advance DRX-400 do Departamento de Química da UFMG, TMS ou o próprio solvente foram usados como referência interna. Para análise de Espectrometria de massas (EM) foi utilizado equipamento MicroQTOF II Bruker, quadrupolo, com fonte de ionização eletrospray (ESI) em modo positivo ou negativo localizado no Departamento de Química da UFPR. O ponto de fusão foi obtido através de método capilar em aparelho PFM-II (MS, Tecnoyon Instrumentação, Brasil), e o ângulo de rotação ótica de luz polarizada foi medido em um polarímetro da marca Jasco® modelo P2000, ambos do Departamento de Química da UFPR.

Para os ensaios de avaliação da atividade biológica foram utilizados os seguintes equipamentos: Para leitura espectrofotométrica dos ensaios de avaliação da proliferação celular utilizou-se o leitor de microplacas Thermo Scientific Multiskan Fc. Também foram utilizados os seguintes equipamentos: microscópio invertido Bioval, centrífuga 5424R Eppendorf (Hamburg, Germany), Centrífuga Heraeus, Centrífuga Sigma 4K15, Incubadora HEPA class 100 Thermo Electron Corporation (localizados no departamento de Análises Clínicas da UFPR), Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® Jem 1200 EX-II (Centro de microscopia eletrônica da UFPR), Citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCalibur, equipado com laser Argônio 488 nm (Hospital de Clínicas da UFPR). Os ensaios realizados em condições de esterilidade foram manipulados em câmara de fluxo laminar vertical TROX modelo FLVQ TAM 12 no Departamento de Análises Clínicas da UFPR.

### 3.1.2 Técnicas cromatográficas

Todas as reações e procedimentos de purificação foram monitorados por CCD, visualizados em luz UV ( $\lambda = 254$  e  $366$  nm) e/ou revelação através de pulverização com reagente de Dragendorff. Foram utilizados os seguintes suportes cromatográficos:

- a) Cromatografia em camada delgada (CCD): placas de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> sobre alumínio (Merck® Alemanha).
- b) Cromatografia em coluna: sílica gel 60 (0,04-0,063 mm) (Merck®, Alemanha).
- c) Cromatografia preparativa circular (Chromatotron, Harrison Research®, EUA) e cromatografia a vácuo em funil sinterizado: sílica gel 60 com gesso e indicador de fluorescência, para cromatografia em camada delgada, 5-40  $\mu\text{m}$  (Merck®, Alemanha).

### 3.1.3 Solventes

Os solventes adquiridos comercialmente foram destilados antes do uso. Para as análises de RMN foram utilizados solventes deuterados [ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] e [ $\text{D}_2\text{O}$ ]. Para as análises de EM foram utilizados solventes grau HPLC (Vetec®, Brasil).

### 3.1.4 Soluções

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água obtida pelo sistema Puritech/Permutation.

As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a  $121^\circ\text{C}$ , 20 min, 1 atm) ou (2) por filtração (0,22  $\mu\text{m}$  – Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para

sua conservação (temperatura ambiente – T.A., 4 – 8°C ou a –20°C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

#### 3.1.4.1 Solução salina fisiológica

Cloreto de sódio 150 mmol/L em água.

#### 3.1.4.2 Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (150 mmol/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (150 mmol/L) e  $\text{NaCl}$  (150 mmol/L) em água. Após ajuste do pH para 7,2–7,4 com solução de  $\text{NaOH}$  1 mol/L, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8°C.

#### 3.1.4.3 Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v)

Azul de Trypan em solução salina tamponada com fosfatos.

#### 3.1.4.4 PBS suplementado (PBSS)

PBS foi suplementado, em condições assépticas, na hora do uso, com soro albumina bovina (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,9 mmol/L) e  $\text{MgCl}_2$  (0,5 mmol/L).

#### 3.1.4.5 Solução hemolisante de Gey

Solução A:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (654,20 mmol/L),  $\text{KCl}$  (24,83 mmol/L),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (6,53 mmol/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,88 mmol/L), glucose (27,77 mmol/L), vermelho de fenol (0,05 g/L). Solução B:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,06 mmol/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,56 mmol/L),  $\text{CaCl}_2$  (3,42 mmol/L). Solução C:  $\text{NaHCO}_3$  (26,78 mmol/L). O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de  $\text{NaOH}$  1 mol/L e os reagentes foram conservados a 4°C. No momento do uso, a solução

hemolisante foi preparada na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e água, respectivamente.

#### 3.1.4.6 Meio RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco<sup>®</sup>) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante e suplementado com 3 g/L de bicarbonato de sódio. O meio foi, então, esterilizado por filtração, usando-se o sistema a vácuo Sterifil, Millipore, com filtro de poro 0,22 µm de diâmetro.

#### 3.1.4.7 Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano

No momento do uso, soro humano obtido de uma mistura de soros provenientes de sangue de, pelo menos, 20 doadores, foi acrescentado ao meio RPMI 1640, na proporção de 1:10, em condições de esterilidade.

#### 3.1.4.8 Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino

No momento do uso, soro fetal bovino adquirido comercialmente, foi acrescentado ao meio RPMI 1640, na proporção de 1:10, em condições de esterilidade.

#### 3.1.4.9 Meio com fito-hemaglutinina (M-PHA)

Meio para cariótipo comercial (Cultilab, Campinas/SP) comprado pronto, contendo PHA em RPMI 1640, HEPES e soro fetal bovino foi conservado à temperatura de -20°C e ao abrigo de luz, conforme instruções do fabricante e descongelado somente na hora do uso.

#### 3.1.4.10 Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (v/v)

Ácido sulfúrico P.A., na proporção de 1:99 em água.

#### 3.1.4.11 Solução de caseína a 5% (p/v)

Caseína em pó foi dissolvida em PBS (50 mg/mL) e aquecida a 56°C por 10 min. A solução foi resfriada rapidamente a 4°C, centrifugada a 1300 rpm por 5 min para remoção de partículas insolúveis, fracionada em alíquotas e armazenada à temperatura de -20°C, sendo descongelada apenas na hora do uso.

#### 3.1.4.12 Solução de Tripsina a 0,25% (p/v)

Tripsina (Worthington Biochemical Corporation), 195 unidades/mg de proteína, foi dissolvida na proporção de 1:400 em PBS e esterilizada por filtração.

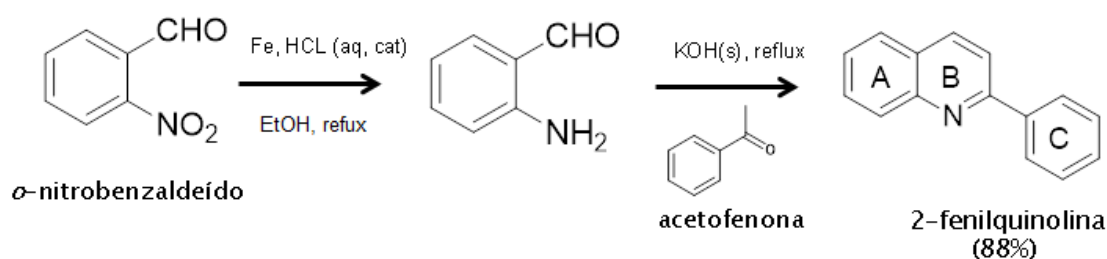
### 3.2 SUBSTRATOS

#### 3.2.1 Obtenção da 2-fenilquinolina

A 2-fenilquinolina foi obtida por síntese química através de reação já descrita na literatura (LI *et al.*, 2007) e foi caracterizada por EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135.

Para síntese da 2-fenilquinolina uma solução contendo 151 mg (1 mmol) de *o*-nitrobenzaldeído em etanol (3 mL) foi colocado na presença de pó de ferro (<10  $\mu\text{m}$ , 223 mg, 4 mmol), seguido pela adição de HCl 0,1 mol/L (0,5 mL, 0,05 mmol) e o resultado da mistura foi vigorosamente agitado em manta de aquecimento a 95°C por 40 minutos. Análise por cromatografia em camada delgada, utilizando HEX/AcOEt 80:20 e como revelador reagente de Dragendorff, demonstrou o término da reação. Então acetofenona (0,10 mL, 1 mmol) e KOH em pó (67,3 mg, 1,2 mmol) foram adicionados cuidadosamente. A mistura foi então agitada vigorosamente a 95°C por 30 minutos. Depois da mistura ser resfriada a mesma foi filtrada, lavando-se o

resíduo com 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . O filtrado foi então diluído em 10 mL de água e a fase aquosa foi então extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 mL) e AcOEt (2 x 15 mL), a fase orgânica foi então combinada, filtrada e o solvente foi evaporado. Posteriormente o extrato seco foi purificado por cromatografia preparativa circular para obtenção da 2-fenilquinolina. O rendimento da reação foi de 88%.

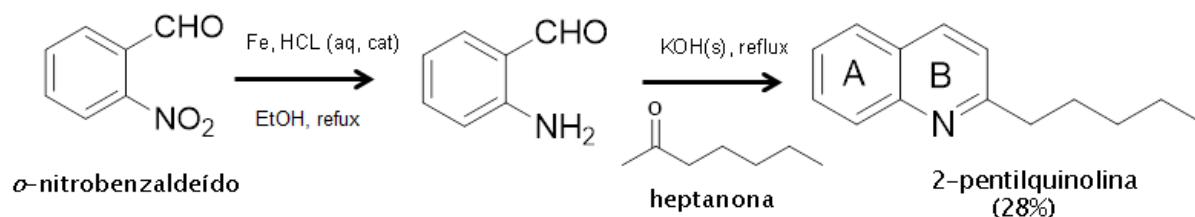


ESQUEMA 2- REAÇÃO DE SÍNTESE DA 2-FENILQUINOLINA

### 3.2.2 Obtenção da 2-*n*-pentilquinolina

Para síntese da 2-*n*-pentilquinolina uma solução contendo 151 mg (1 mmol) de *o*-nitrobenzaldeído em etanol (3 mL) foi colocado na presença de pó de ferro (<10  $\mu\text{m}$ , 223 mg, 4 mmol), seguido pela adição de HCl 0,1 mol/L (0,5 mL, 0,05 mmol) e o resultado da mistura foi vigorosamente agitado em manta de aquecimento a 95°C por 40 minutos. Análise por cromatografia em camada delgada, utilizando HEX/AcOEt 80:20 e como revelador reagente de Dragendorff, demonstrou o término da reação. Então heptanona (0,10 mL, 1 mmol) e KOH em pó (67,3 mg, 1,2 mmol) foram adicionados cuidadosamente e a mistura foi então agitada vigorosamente a 95°C por 30 minutos. Depois da mistura ser resfriada a mesma foi filtrada, lavando-se o resíduo com 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . O filtrado foi então diluído em 10 mL de água e a fase aquosa foi então extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 mL) e AcOEt (2 x 15 mL), a fase orgânica foi então combinada, filtrada e o solvente foi evaporado. Posteriormente o extrato seco foi purificado por cromatografia preparativa circular para obtenção da 2-*n*-pentilquinolina. O rendimento da reação de 28%.





ESQUEMA 3- REAÇÃO DE SÍNTESE DA 2-*n*-PENTILQUINOLINA

### 3.3 REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO

#### 3.3.1 Biotransformação em escala analítica (*screening*)

##### 3.3.1.1 Microrganismos

Os microrganismos (Tabela 1) foram mantidos sob refrigeração a 4°C em meio de cultura sólido PDA (ágar batata-dextrose) e foram repicados para um novo meio de cultura a cada 15 dias.

##### 3.3.1.2 Triagem de microrganismos em escala analítica

O meio de cultura líquido foi preparado contendo 20 g/L de D-(-)-glucose (dextrose), 8 g/L de extrato de malte e 4 g/L de extrato de levedura em H<sub>2</sub>O destilada. Um volume de 50 mL de meio de cultura líquido foi transferido para *erlenmeyers* (250 mL), os quais foram esterilizados em autoclave por 20 min (120°C, 1 atm). Foram testados um total de 23 microrganismos (21 fungos, 1 levedura e 1 bactéria), os quais estão relacionadas na Tabela 1. Os microrganismos foram inoculados em meio de cultura estéril e incubados em um agitador-incubador orbital (*shaker*) a 28°C e 150 rpm durante 48 a 72 h, dependendo da cepa. Após esse período, 0,5 mL de uma solução de 2-fenilquinolina e 2-*n*-pentilquinolina dissolvidos em acetona (20 mg/mL) foram

adicionados ao meio de cultura e os frascos mantidos por mais sete dias sob agitação constante, nas mesmas condições iniciais. Para cada microrganismo foi preparado um frasco controle contendo apenas meio de cultura e acetona (0,5 mL).

Após sete dias de fermentação, o caldo foi filtrado em funil de Buchner. O micélio foi lavado com H<sub>2</sub>O destilada (20 mL) e o filtrado transferido para um funil de separação e extraído com DCM (3 X 20 mL), separando-se a fase orgânica da aquosa. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 X 20 mL). O micélio foi extraído com AcOEt durante 30 min, e o extrato orgânico foi filtrado. As fases orgânicas (DCM, AcOEt, extrato AcOEt) foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, os solventes evaporados à secura em rotavapor e analisadas em CCD, empregando-se várias fases móveis com diferentes graus de polaridade, comparando-se com os controles. A fase aquosa foi descartada ao final.

TABELA 1: MICRORGANISMOS USADOS NOS EXPERIMENTOS EM ESCALA ANALÍTICA

MICRORGANISMOS	Incubação (h)*	MICRORGANISMOS	Incubação (h)*
<i>Acremonium</i> sp. 321	72	<i>Geotrichum</i> sp. S168	72
<i>Acremonium</i> sp. 193	72	<i>Gibberella</i> sp.	48
<i>Aspergillus flavus</i>	48	<i>Mycelia sterilia</i> (15b)	72
<i>Aspergillus fumigatus</i>	72	<i>Penicillium citreonigrum</i>	48
<i>Aspergillus niger</i>	72	(13b)	
<i>Aspergillus oryzae</i>	48	<i>Penicillium</i> sp. (10b)	48
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	72	<i>Penicillium</i> sp. (3a)	72
<i>Chaetomium</i> sp. 56	72	<i>Penicillium</i> sp. 64	72
Demáceo S328	48	<i>Rhizopus microsporus</i>	72
<i>Fusarium</i> sp.(14A)	48	<i>Rhizopus oryzae</i>	48
<i>Fusarium</i> sp. 162	48	<i>Saccharomyces cerevisae</i>	72
<i>Fusarium verticillio</i>	48	<i>Streptomyces</i> sp.	72

\*período de incubação de cada microrganismo antes de adicionar os substratos ao meio

### 3.3.1.3 Reações de biotransformação em escala preparativa com o substrato 2-fenilquinolina

Os fungos *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* foram selecionados na etapa de triagem em escala analítica, uma vez que evidenciaram por meio de CCD a presença de derivados da FQ. Esses fungos foram inoculados em meio de cultura líquido previamente esterilizado (50 mL) e incubados em *shaker* orbital a 28°C e 150 rpm, respeitando o tempo de crescimento necessário de cada fungo. Após esse período os microrganismos foram transferidos para frascos de 1000 mL contendo 200 mL de meio cultura líquido fresco, onde permaneceram por mais 48 h. Após este período, 100 mg de FQ dissolvidos em acetona, foram adicionados em cada frasco. Um frasco controle, no qual foi adicionado somente acetona, foi preparado para cada fungo.

Após sete dias de fermentação, os caldos foram filtrados em funil de Buchner, enquanto o micélio foi lavado com H<sub>2</sub>O destilada (50 mL). O filtrado foi transferido para um funil de separação e extraído com AcOEt (3 x 100 mL). Os micélios foram sonicados em AcOEt por cerca de 2 h e reunidos com as fases orgânicas. As frações orgânicas foram secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente evaporado à secura e o produto bruto foi analisado por CCD.

Para obtenção de quantidades dos derivados adequadas à caracterização estrutural e aos testes biológicos, os experimentos em escala preparativa foram repetidos de três a quatro vezes, sob as mesmas condições. Os extratos brutos da biotransformação foram submetidos a técnicas cromatográficas (cromatografia circular, em coluna e a vácuo) e a processos de recristalização para o fracionamento dos extratos e isolamento dos derivados da FQ.

### 3.3.1.4 Biotransformação por *Aspergillus fumigatus*

Um total de 800 mg de FQ foram adicionados ao meio de cultura contendo o fungo *A. fumigatus* em crescimento, divididos em oito frascos (100 mg/frasco). Após comparação por CCD, os extratos do filtrado e do

micélio (760,0 mg) foram reunidos para fracionamento em coluna a vácuo, usando gradientes de HEX e AcOEt, com proporção crescente de AcOEt. As frações contendo a substância de interesse foram separadas e submetidas a novo fracionamento em cromatografia circular. Este procedimento foi repetido até a obtenção da substância denominada DFQ1 (62,8 mg, rendimento de 8%).

#### 3.3.1.5 Biotransformação por *Aspergillus flavus*

Um total de 800 mg de FQ foram adicionados ao meio de cultura contendo o fungo *A. flavus* em crescimento, divididos em oito frascos (100 mg de FQ por frasco). Após comparação por CCD, os extratos do filtrado e do micélio (660,0 mg) foram reunidos para fracionamento em coluna a vácuo, usando gradientes de HEX e AcOEt, com proporção crescente de AcOEt. As frações contendo a substância de interesse foram separadas e submetidas a novo fracionamento em cromatografia circular, este procedimento foi repetido até a obtenção da substância de interesse DFQ2 (42,5 mg, rendimento de 5%).

### 3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.4.1 Atividade leishmanicida

##### 3.4.1.1 Cepa do parasito e cultura celular

Três cepas obtidas da Coleção de *Leishmanias* do Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional para Tipagem de *Leishmania*, denominadas *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR,1975/M2903) e *L. (L.) infantum* (MHO/BR/2002/LPC-RPV) foram utilizadas nos experimentos.

As formas promastigota semeadas em ágar-sangue, com um baixo número de passagens (três a sete) foram coletadas e transferidas para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio M199 (Gibco-BRL), que foi preparado

diluindo-se o pó para meio 199 em água destilada e adicionando-se HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005% (p/v), suplementado com 20% (p/p) de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS). O meio foi esterilizado por filtração e mantido em prova de esterilidade durante 24 h a 37°C. As culturas foram mantidas em estufa a 25°C. As formas promastigotas foram analisadas em microscópio invertido.

#### 3.4.1.2 Ensaio de susceptibilidade das formas promastigotas

Formas promastigotas em fase logarítmica (5 dias) foram quantificadas em câmara de Neubauer sob microscopia de luz e a concentração ajustada para  $2 \times 10^7$  células/mL. As formas promastigotas de *Leishmania* foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 50-100 µL adicionados em cada poço ( $3 \times 10^6$  células/poço) e mantidas a 25°C por 24 h.

#### 3.4.1.3 Tratamento *in vitro*

As substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2 foram dissolvidas em DMSO na concentração de 0,1%. Posteriormente, as substâncias foram dissolvidas em meio de cultura em diferentes concentrações (4, 16, 64, 256, 1024 e 2048 µM). Os efeitos de cada substância contra formas promastigotas foram avaliados em intervalos de 24, 48 e 72 h. Cada experimento foi realizado em triplicata. DMSO dissolvido em meio de cultura foi utilizado como controle. Anfotericina B (20 µM) e antimoniato de *N*-metil-glucamina (Glucantime®, 500 µM), dois medicamentos mais utilizados para o tratamento da doença, além de Triton X-100 (20%), foram usados como controle positivo de morte. Após cada período de incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT como descrito no item 3.4.1.4.

#### 3.4.1.4 Ensaio de viabilidade

A viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método colorimétrico de morte por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT). Após cada período de incubação, 30  $\mu$ L de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (M2128 - Sigma-Aldrich) na concentração de 5 mg/mL foram adicionados e mantidos por 2 h a 24°C. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de solução de dodecilsulfato de sódio-SDS. Cada poço foi homogeneizado e a absorvância foi observada à 595 nm em leitora de microplacas. Os resultados obtidos foram comparados com a absorvância de uma cultura de células controle, tratadas da mesma maneira. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células sem tratamento), para o qual foi atribuído 100%. Anfotericina B, antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) e Triton X-100 foram usados como controles positivos de morte celular.

#### 3.4.1.5 Citotoxicidade em macrófagos

Células Raw 264.7 (ATCC® TIB-71™) foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (p/v) de soro bovino fetal, 1 UI/mL de penicilina, 1  $\mu$ g/mL de estreptomicina, a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas não mais do que vinte passagens.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/poço). Após 6 h, as células foram tratadas com 4, 16, 64, 256, 1024 e 2048  $\mu$ M de FQ, assim como com DFQ1 e DFQ2, por 24, 48 e 72 h. DMSO dissolvido no meio de cultura foi usado como grupo controle. Triton X-100 foi usado como controle positivo de morte, esse foi adicionado 2 h antes da adição da solução de MTT. Após cada tempo a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método do MTT como descrito no item 3.4.1.4.

#### 3.4.1.6 Citotoxicidade em células McCoy

Fibroblastos não tumorais de camundongos foram mantidos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% (p/v) de soro bovino fetal, 1 U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram mantidas não mais do que vinte passagens.

As células foram transferidas para placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço). Após 6 h, as células foram tratadas com 4, 16, 64, 256, 1024 e 2048 µM de FQ, assim como com DFQ1 e DFQ2, por 24, 48 e 72 h. DMSO dissolvido no meio de cultura foi usado como grupo controle. Triton X-100 foi usado como controle positivo de morte, sendo adicionado 2 h antes da adição da solução de MTT. Após cada tempo a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método do MTT como descrito no item 3.4.1.4.

#### 3.4.1.7 Análise por microscopia eletrônica de transmissão

A ultraestrutura das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão, após o tratamento com a Cl<sub>50</sub> das substâncias DFQ1 e DFQ2, com o objetivo de avaliar possíveis alterações nas organelas e na ultraestrutura da célula como um todo. Para isto os parasitos foram coletados no tempo de 72 h após o tratamento e centrifugados por 5 min. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e fixadas em solução contendo glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2%, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 a 4 °C por 24h. As amostras foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M e pós fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% (1:1). A contrastação *in block* foi realizada com solução aquosa de acetato de uranila 0,5%, 4°C por 24 h, protegido da luz. As amostras foram submetidas a desidratação em série de acetona em concentrações crescentes a 50%, 70%, 90% e 100% (duas vezes), por 5 min cada etapa. Após a desidratação as células foram lentamente embebidas em resina Spurr's diluídas em acetona 100% na seguinte proporção 1:2, 1:1, 2:1 (resina:acetona). Em seguida, o

material foi colocado em resina pura 6 h e depois em formas de silicone para polimerização a 64 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo (Leica®) e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas e as imagens adquiridas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® Jem 1200 EX-II.

### 3.4.2 Atividade anti-inflamatória

#### 3.4.2.1 Obtenção de leucócitos humanos

O protocolo para obtenção de leucócitos humanos foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob registro CEP/SD: 039.S1.003/04-0. Amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários sadios (10 mL, após consentimento informado, colhidas em seringas estéreis e anticoaguladas com heparina, foram utilizadas para obtenção das diferentes populações de leucócitos humanos).

#### 3.4.2.2 Separação das populações de leucócitos humanos

Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GNC: polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação, usando-se *Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS* 1,077 g/cm<sup>3</sup> (Amersham, Biosciences). Após centrifugação a 200 rpm por 10 min a T.A., o plasma rico em plaquetas foi retirado e o volume original reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800 rpm por 25 min permitiu a separação do creme leucocitário, que foi submetido ao gradiente de densidade. Com centrifugação de 200 rpm por 30 min a T.A., os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados duas vezes com PBS (800 rpm/5 min), ressuspensos em RPMI suplementado e a concentração ajustada para 10<sup>6</sup> células/mL, após contagem em hemocitômetro de Neubauer. Os granulócitos recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante de Gey foram lavados duas



vezes com PBS (800 rpm/5 min), ressuspensos em PBSs, enumerados com o auxílio de um hemocítômetro de Neubauer Improved, e sua concentração igualmente ajustada para  $10^6$  células/mL.

#### 3.4.2.3 Viabilidade e citotoxicidade celulares

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com Azul de Trypan (MERCHANT, 1964). Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução de Azul de Trypan 0,4% e sua viabilidade observada ao microscópio óptico (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis se mostraram coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. A toxicidade sobre leucócitos humanos das substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2 foi avaliada, para isso as amostras foram dissolvidas em DMSO na concentração de 0,1%, posteriormente as substâncias foram dissolvidas em meio de cultura nas concentrações de 0,005, 0,05, 0,5, 5 e 50  $\mu$ M. Para MNC, as amostras foram incubadas por 5 dias, a 37°C, em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. Para GNC, as amostras foram incubadas a 37°C por 5 h.

#### 3.4.2.4 Preparo de citocentrifugados

Para observação da composição das frações de mononucleares e de granulócitos ensaiados, citocentrifugados contendo  $8 \times 10^4$  células foram preparados após centrifugação a 1500 rpm por 5 min em T.A., sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro™ (Wescor). Em seguida, as lâminas secas ao ar foram coradas com May-Grünwald-Giemsa (DACIE, 1995) e as células diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico. Fotografias foram obtidas usando-se o programa TsView versão 7.3.1.7, acoplado ao microscópio.

#### 3.4.2.5 Coloração de MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Lâminas contendo citocentrifugados secos ao ar foram recobertas completamente com o corante de May-Grünwald por 3 min; posteriormente, o corante foi diluído com gotas de água destilada tamponada (pH 6,8) por 1 min. Em seguida, as lâminas foram recobertas com corante de Giemsa diluído em água tamponada (1:20) por 15 min, e, finalmente, as mesmas foram lavadas em água corrente e secas ao ar.

#### 3.4.2.6 Polarização leucocitária

O ensaio de polarização foi realizado com leucócitos obtidos de doadores sadios usando-se técnica semelhante à descrita por Wilkinson e Haston (1988). A morfologia celular de uma suspensão a  $10^6$  leucócitos/mL em PBSs enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SBF) foi observada imediatamente ( $t = 0$  min) e após incubação a  $37^\circ\text{C}$ , por 30 min ( $t = 30$  min), para os tubos controle (sem caseína) e teste (na presença de caseína) e também das substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2.

Anteriormente à visualização microscópica, as células foram fixadas em glutaraldeído (Sigma) a 2,5% (v/v) em PBS, por 5 min, a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBSs. O efeito da polarização induzida pela caseína foi observado em microscópio invertido Olympus CBX40 e registrado fotograficamente com o auxílio do Programa TsView versão 7.3.1.7.

#### 3.4.2.7 Quimiotaxia de granulócitos

A quimiotaxia dos granulócitos foi observada em câmaras de Boyden, (WILKINSON e HASTON, 1988, LEE *et al.*, 1999), sendo este ensaio realizado em duas etapas. Na primeira série de experimentos, granulócitos humanos ( $2 \times 10^5$ ) separados por gradiente de densidade foram adicionados ao compartimento superior de câmaras de Boyden e expostos a concentrações de FQ, DFQ1 e DFQ2 (0,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) incorporados em DMSO 0,1% e adicionados a

PBS suplementado, localizados no compartimento inferior. Filtros de polycarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore, Neuroprobe), com poros de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por 90 min e o número de leucócitos que migraram ativamente para o compartimento inferior foi enumerado com o auxílio de um hemocítômetro.

Na segunda série de experimentos, os granulócitos foram pré-tratados com concentrações de FQ, DFQ1 e DFQ2 (0,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) por 30 min, a 37°C. Em seguida, foram lavados (800 rpm/5 min), ressuspensos em PBSs, adicionados ao compartimento superior de câmaras de Boyden e estimulados a migrar contra um gradiente de 0,5% de caseína, presente no compartimento inferior do sistema. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por 90 min e o número de leucócitos que migraram para o compartimento inferior contado. Dexametasona ( $10^{-3}$  M) foi utilizada como controle de inibição do procedimento experimental.

O monitoramento do movimento espontâneo dos leucócitos (controle) e a influência do solvente sobre a migração de GNC foram realizados com adição de PBSs e DMSO, respectivamente, no compartimento inferior da câmara.

Os resultados estão expressos como porcentagem média de células recuperadas do compartimento inferior das câmaras em relação aos resultados obtidos para o PBSs (controle) ou aquele induzido por caseína, na ausência das substâncias testadas.

#### 3.4.2.8 Ensaio de imunomodulação

Para avaliar os efeitos imunomodulatórios, MNC ( $10^6$  células/mL) foram incubados em RPMI 1640 (Gibco) contendo 10% (v/v) de soro humano e na presença de concentrações crescentes (0,005 a 50  $\mu\text{M}$ ) de FQ, DFQ1 e DFQ2, em placas estéreis de 96 cavidades (TPP), a 37°C por 5 dias, em atmosfera de 5-10% de  $\text{CO}_2$ . Em alguns experimentos, avaliou-se o efeito das substâncias sobre MNC na presença de mitógeno, adicionando-se 10% (v/v) do meio de cultura comercial denominado M-PHA (Meio Para Cariótipo Enriquecido Com Fito-hemaglutinina – Cultilab - Campinas/SP) à mistura. Cada ensaio foi

realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

#### 3.4.2.9 Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente

A morfologia das células dos diferentes grupos foi observada em citocentrifugados corados sob imersão em microscópio de luz. Linfócitos foram reconhecidos por seu aspecto morfológico característico, apresentando-se como células arredondadas, pequenas, mantendo elevada relação núcleo-citoplasmática, citoplasma geralmente escasso, de coloração azul, ausência de granulação específica, núcleo arredondado e denso, com cromatina densa com agregados irregulares e eventual presença de estruturas semelhantes a nucléolos, porém mal definidos. Linfócitos transformados pela ação da fito-hemaglutinina foram considerados como blastos ou linfoblastos e identificados como células maiores do que linfócitos não-ativados, citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como a área não corada ao redor do núcleo; cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos visíveis, proeminentes e delineados, com volume aumentado (LEE *et al.*, 1999).

#### 3.4.2.10 Expressão de moléculas de adesão na superfície dos leucócitos

Amostras de sangue contendo aproximadamente  $10^6$  leucócitos (100  $\mu$ L) foram incubadas, por 24 h, com FQ, DFQ1 e DFQ2 nas concentrações de 5 e 50  $\mu$ M; em seguida, as células foram lavadas com PBS e adicionadas de 5  $\mu$ L (2  $\mu$ g/mL) de solução de anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) para VLA-4 (Pharmingen/BD) e anticorpos monoclonais conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) para VLA-5 (Immunotech) e LFA-1 (Pharmingen/BD). Após incubação ao abrigo da luz por 15 min a T.A., adicionou-se 2 mL de solução *FACS<sup>TM</sup> Lysing Solution* (Becton Dickinson) em cada tubo. Após 10 min a T.A. em ambiente escuro, as células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS (800 rpm/5 min) e ressuspensas em 0,5 mL de

solução de paraformaldeído 1%. Os níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 pelos diferentes tipos de leucócitos foram analisados em um citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCalibur, equipado com laser Argônio 488 nm. Para discriminar a população de monócitos, 5  $\mu$ L (2  $\mu$ g/mL) de solução de anticorpos monoclonais para VLA-5 e para LFA-1, ambos conjugados ao FITC, foram usados concomitantemente com 5  $\mu$ L (2  $\mu$ g/mL) de solução de anticorpos monoclonais para CD11c conjugado à APC (Pharmingen/BD).

#### 3.4.2.11 Avaliação da migração celular

O ensaio de cicatrização *in vitro* foi realizado de acordo com metodologia descrita por Lampugnani (1999), com algumas modificações. Células McCoy uma linhagem de células originada de fibroblastos de tumor de camundongo foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO®-LifeTechnologies), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) (GIBCO®-LifeTechnologies) e 100 U/mL de penicilina-estreptomicina em frascos apropriados para cultura de células (TPP®) e mantidos a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>.

Após atingirem 80% de confluência, os fibroblastos foram tripsinizados e semeados em placas de 12 poços de fundo chato (2,5x10<sup>5</sup> cel/poço) e mantidos nas condições citadas acima. Após 48 h, quando o fundo dos poços apresentava-se completamente coberto pelo tapete de células (culturas confluentes), foram realizados sulcos com o auxílio de uma ponteira de 200  $\mu$ L, estéril, imitando uma lesão (*scratch*) na monocamada de células. O sobrenadante foi removido para a retirada de fibroblastos não aderidos e os poços foram novamente preenchidos com soluções de FQ, DFQ1 e DFQ2, nas concentrações de 0,5, 5, 50 e 100  $\mu$ M, a fim de serem testadas em sua capacidade de regeneração da lesão; as soluções foram preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 0,1% de DMSO. Meio RPMI 1640 suplementado com 1 ou 10% de SBF e 0,1% de DMSO foi utilizado como controle. A regeneração/migração celular foi avaliada após 24 h de tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata e as imagens das culturas foram captadas em microscópio invertido Olympus CBX40 e registradas

fotograficamente com o auxílio do Programa TsView versão 7.3.1.7, sendo as áreas da lesão mensuradas com o auxílio do programa Photoshop 6.0.

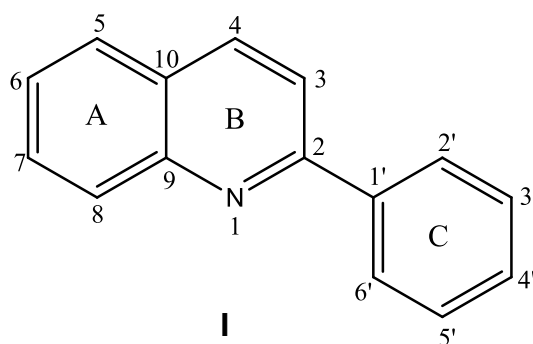
#### 3.4.2.12 Análise estatística

Os testes biológicos foram realizados três ou quatro vezes em experimentos independentes e cada concentração foi testada em quadruplicata. Todos os dados obtidos das atividades biológicas foram submetidos à análise estatística. Os resultados de atividades biológicas estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) das várias repetições dos experimentos. Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste “t” de Student e a Análise de Variância (ANOVA), com execução do teste de Tukey. Os cálculos foram realizados utilizando os programas *GraphPad-Prism* 5, versão 2007, e *Microsoft Office Excel* 2010. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os valores de  $CI_{50}$  (concentração requerida para ocasionar 50% de inibição) foram calculados por análise de regressão linear a partir dos valores de Kc das concentrações utilizadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

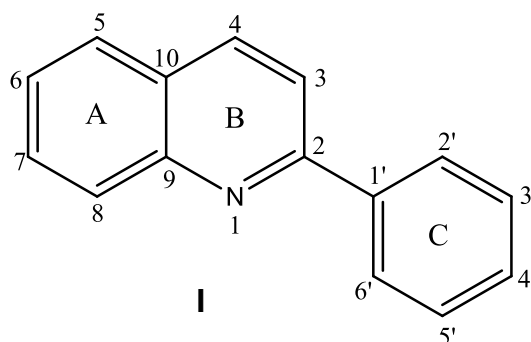
### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA 2-FENILQUINOLINA

A FQ (**I**) obtida por síntese química conforme reação já descrita por Li (2007) apresentou-se como pó fino com coloração branca, faixa de fusão 80-85°C.



O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  206,14  $[M-H]^+$ , correspondente à massa 205 Da, para um composto com fórmula molecular  $C_{15}H_{11}N$ .

A estrutura da FQ foi confirmada por meio de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C comparando-se os valores de deslocamento químico com os dados relatados na literatura (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007), conforme Tabela 2. O espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura 4), demonstrou a presença de onze hidrogênios ligados a carbonos aromáticos: quatro dupletos em 8,37, 8,12, 8,08 e 7,94 ppm; um duplo duplete em 8,31 ppm, um tripleto em 7,77 ppm e dois multipletos em 7,75 e 7,54 ppm; alguns hidrogênios apresentam o mesmo valor de deslocamento devido a simetria encontrada na molécula. Esses dados, compilados na Tabela 2, estão de acordo com os encontrados na literatura (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007).

TABELA 2- DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  DA 2- FENILQUINOLINA

H	$\delta^1$ (ppm)	$\delta^2$ (ppm)	$\delta^3$ (ppm)
H <sub>4</sub>	8,37 (1H, d, J= 8,6 Hz)	8,23 (1H, d, J=8,6 Hz)	8,15-8,28 (m, 4H)
H <sub>2'</sub> , H <sub>6'</sub>	8,31 (2H, dd, J= 1,5; J= 8,5 Hz)	8,20 (2H, d, J= 7,0 Hz)	7,85 (d, J= 8,08 Hz, 1H)
H <sub>8</sub>	8,12 (1H, d, J= 8,6 Hz)	8,18 (1H, d, J=7,9 Hz,)	7,70-7,78 (m, 1H)
H <sub>3</sub>	8,08 (1H, d, J= 8,6 Hz)	7,85 (1H, d, J=8,6 Hz)	7,53-7,57 (m, 3H)
H <sub>5</sub>	7,94 (1H, d, J= 8,2 Hz)	7,81(1H, d, J=8,1Hz)	7,46-7,51 (m,1H)
H <sub>7</sub>	7,77 (1H, t, J= 7,04 Hz)	7,76 (1H, t)	7,43 (d, J= 8,59 Hz, 1H)
H <sub>6</sub>	7,70-7,80 (1H, m)	7,51 (1H, m)	
H <sub>3'</sub> , H <sub>4'</sub> , H <sub>5'</sub>	7,45-7,60 (3H, m)	7,48-7,55 (3H, t, J=7,0 Hz, H3', H5')	

NOTA: <sup>1</sup>Dados experimentais, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 200 MHz)<sup>2</sup>GIMENEZ *et al*, 2005; (CDCl<sub>3</sub>), 400 MHz<sup>3</sup>LI *et al.*, 2007; (CDCl<sub>3</sub>), 400 MHz



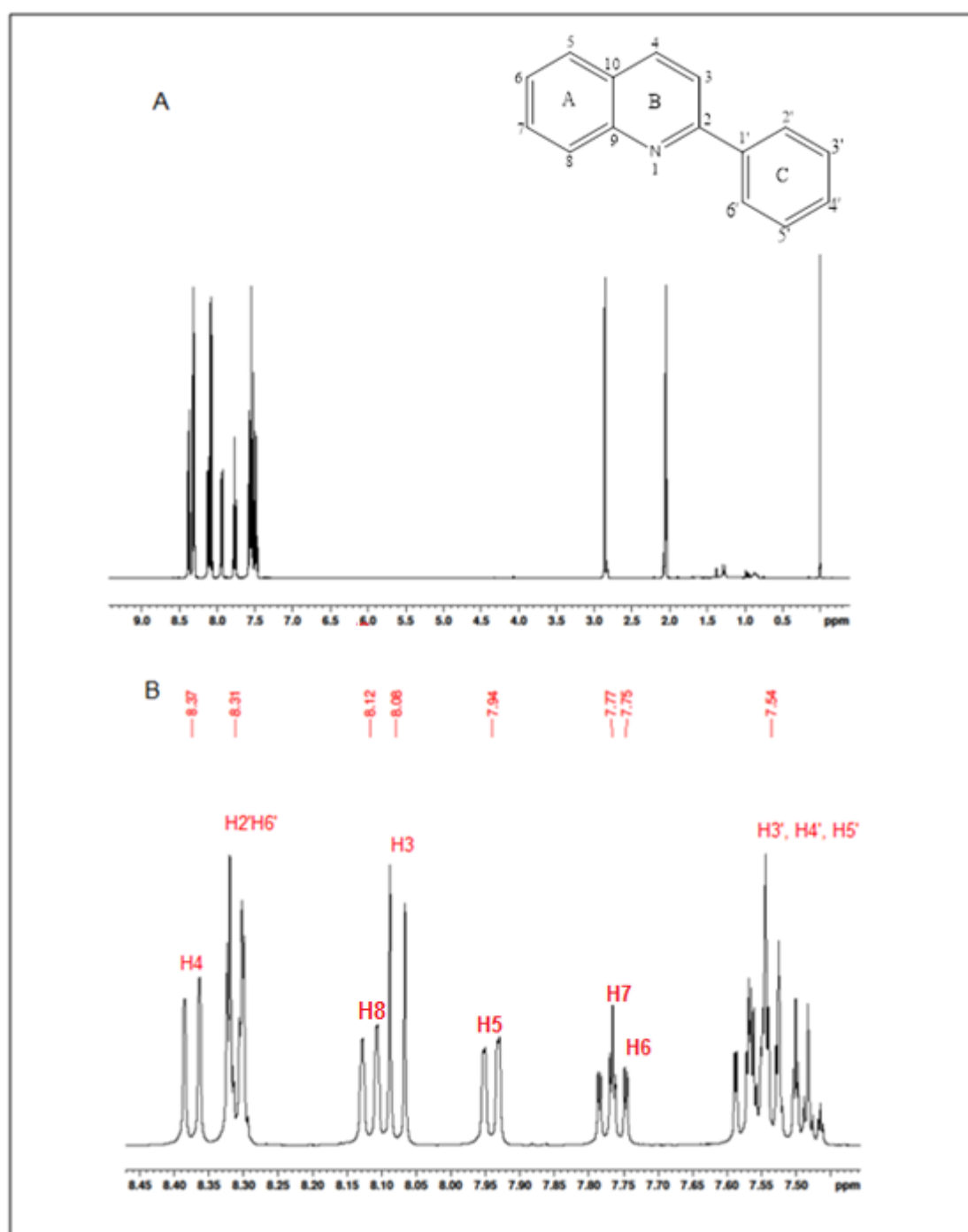


FIGURA 4- (A) ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  [200 MHz, EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DA 2-FENILQUINOLINA; (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 7,40 E 8,45 ppm.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 5), cujos dados estão resumidos na Tabela 3, estão de acordo com os da literatura (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007) e revelou sinais correspondentes aos quinze carbonos aromáticos da FQ, encontrados em região mais desblindada do espectro ( $\delta$  100 a 160 ppm).

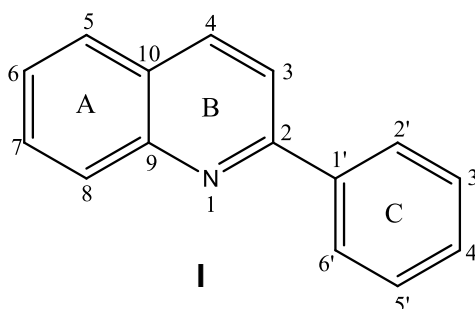


TABELA 3- DADOS DE RMN $^{13}\text{C}$  DA 2- FENILQUINOLINA

	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>2</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>3</sup>
C2	157,4	157,2	157,39
C3	119,8	118,0	136,84
C4	137,8	136,6	129,75
C5	127,2	127,4	129,36
C6	130,3	129,5	128,88
C7	130,4	129,8	127,62
C8	130,5	129,9	127,49
C9	149,1	148,2	127,22
C10	127,2	127,3	129,71
C1'	140,2	139,6	127,20
C2'	128,2	127,6	126,33
C3'	129,6	128,9	119,04
C4'	128,5	126,2	127,20
C5'	129,6	128,9	127,20
C6'	128,2	127,6	127,20

NOTA: <sup>1</sup>Dados experimentais (CD $_3$ ) $_2$ CO, 50 MHz

<sup>2</sup>GIMENEZ *et al.*, 2005; (CDCl $_3$ ), 100 MHz

<sup>3</sup>LI *et al.*, 2007; (CDCl $_3$ ), 100 MHz

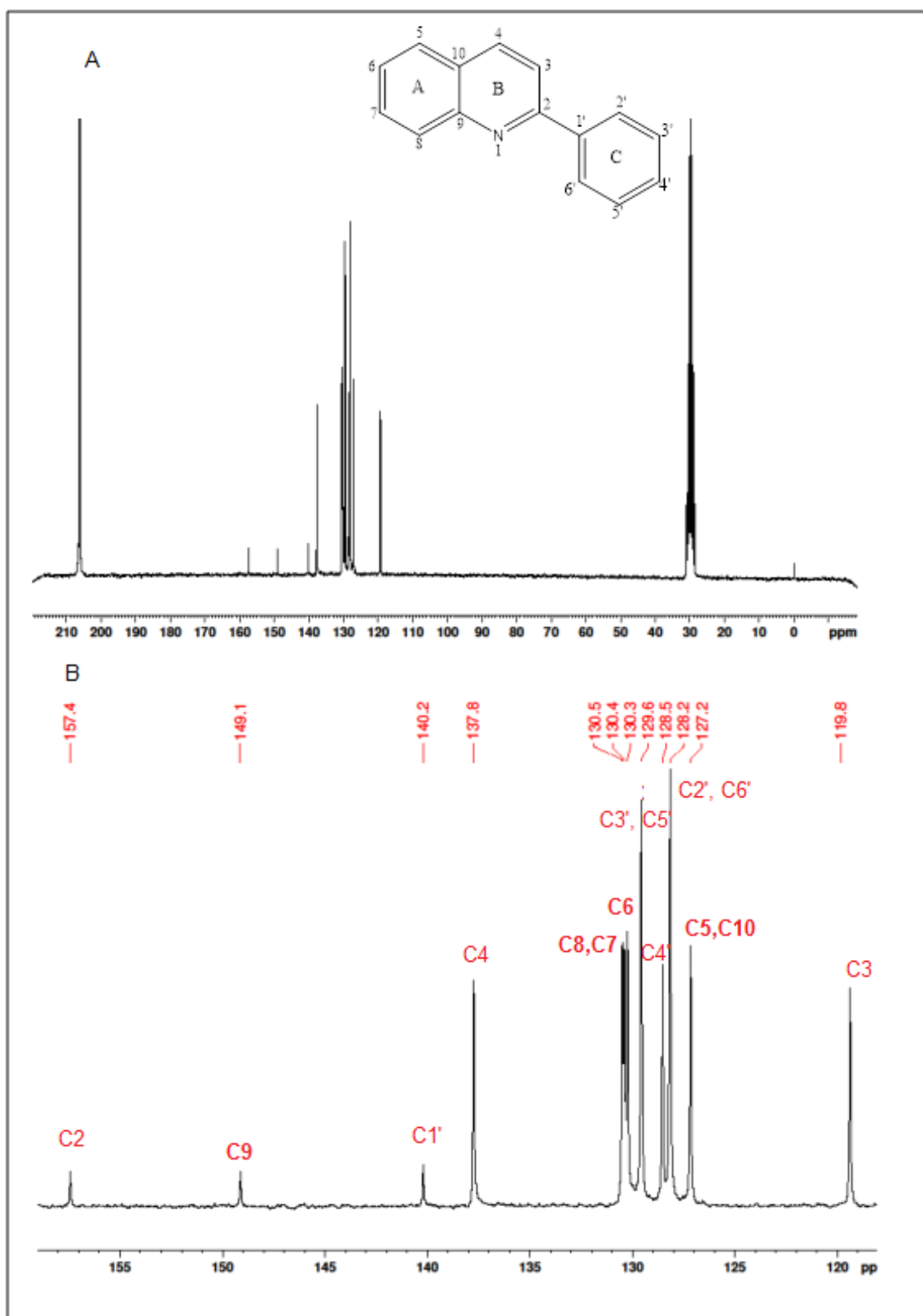
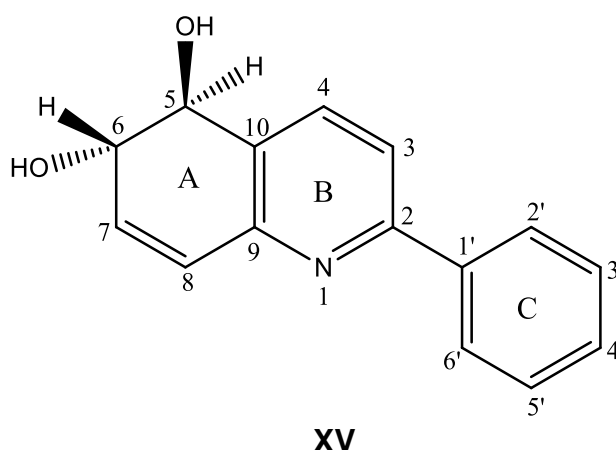


FIGURA 5- (A) ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ], DA 2-FENILQUINOLINA; (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 119,0 E 160,0 ppm.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DA FQ

### 4.2.1 Caracterização do metabólito DFQ1 obtido por biotransformação da FQ pelo fungo *Aspergillus fumigatus*.

O processo de biotransformação da FQ pelo fungo *A. fumigatus* levou à formação do derivado DFQ1 (XV), um sólido branco, amorfo. Essa substância foi analisada por CCD (HEX: AcOEt, 70:30), mostrando fluorescência quando submetida à luz UV e tornou-se alaranjada quando revelada com o reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de uma substância nitrogenada. A rotação óptica específica foi de  $[\alpha]_D^{25} = +5,15^\circ$  (acetona). Faixa de fusão: 255-257°C.



O espectro de massas mostrou o pico do íon molecular com razão  $m/z$  igual a 240,24  $[M-H]^+$ , correspondendo a massa 239 Da, para um composto com fórmula molecular  $C_{15}H_{13}NO_2$ .

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figuras 6) foi analisado. Sinais de hidrogênios de dois grupamentos OH em 5,03 e 4,69 ppm (Figura 6) apareceram como dois sinpletos largos. Próximos à mesma região, foi possível observar um duplete em 4,86 ppm (1 H) e um tripleto duplo em 4,50 ppm (1 H), correspondentes aos dois hidrogênios ligados nas posições H-5 e H-6 onde também estão ligados os grupos hidroxila inseridos nessas posições. Importante destacar o valor das constantes de acoplamento nesses hidrogênios ( $J = 10,69$  Hz), portanto

indicando a presença do estereoisômero *trans* da substância. A expansão do espectro na região de 6,00 a 6,70 ppm (Figura 8) corresponde aos hidrogênios ligados nas posições H-7 e H-8, os sinais apareceram como dois dupletos duplos. Já na expansão do espectro na região entre 7,00 e 8,20 ppm (Figura 9) foi possível observar dois dupletos em 7,76 e 7,97 ppm referentes aos hidrogênios nas posições H-3 e H-4; o multiplete visualizado em 8,10 ppm é referente aos H-2' e H-6'. Já o multiplete em 7,47 corresponde aos H-3' e H-5'). O tripleto triplo em 7,41 ppm foi atribuído ao H-4'.

As atribuições dos sinais dos hidrogênios de DFQ1 no espectro de RMN<sup>1</sup>H e os dados da fenilquinolina, para fins de comparação, estão relacionados na Tabela 4.

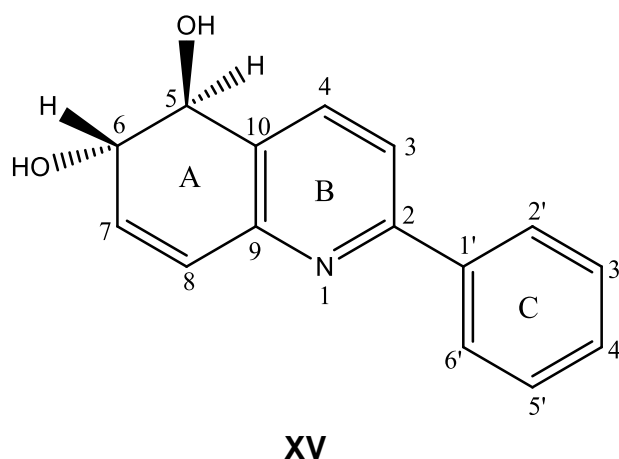


TABELA 4- DADOS DE RMN<sup>1</sup> H DE (DFQ1) OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO *Aspergillus fumigatus* E DA FENILQUINOLINA (FQ)

H	$\delta^1$ (ppm)	$\delta^2$ (ppm)
H-3	7,76 (d, J=8,16 Hz)	8,08 (d, J=8,6 Hz)
H-4	7.97 (d, J=8,16 Hz)	8,37 (d, J= 8,6 Hz)
H-5	4,86 (d, J=10,69Hz)	7,94 (d, J= 8,2 Hz)
H-8	6,59 (dd, J=2,23 Hz; J=10,06 Hz)	8,12 (d, J=8,6 Hz)
H-7	6,30 (dd, J=2.23 Hz; J=10,06 Hz)	7,77 (t, J=7,04 Hz)
H-6	4,50 (td, J=2.23 J=10,69 Hz)	7,70-7,80 (m)
H-2',H-6'	8,00-8,20 (m)	8,31 (dd, J= 1,5; J= 8,5 Hz)
H-3', H-5'	7,45-7,52 (m)	7,45-7,60 (m)
H-4'	7,41 (tt, J=7,21Hz)	7,45-7,60 (m)
OH	5,03 (sl)	
OH	4,69 (sl)	

NOTA: <sup>1</sup>Dados experimentais do DFQ1, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400 MHz

<sup>2</sup>Dados experimentais da FQ, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400 MHz

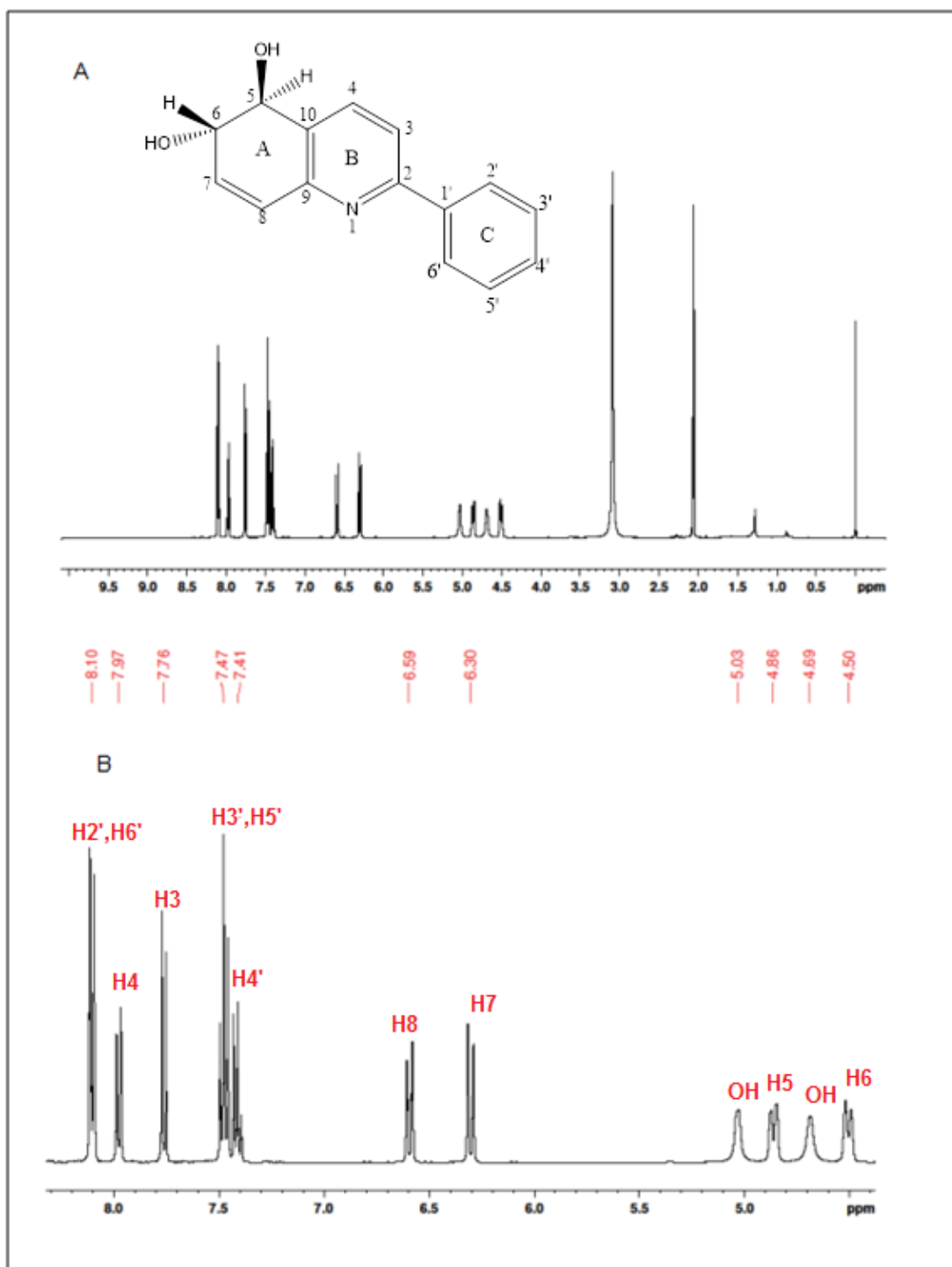


FIGURA 6- (A) ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$  [400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ1. (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 3,90 A 8,30 ppm.

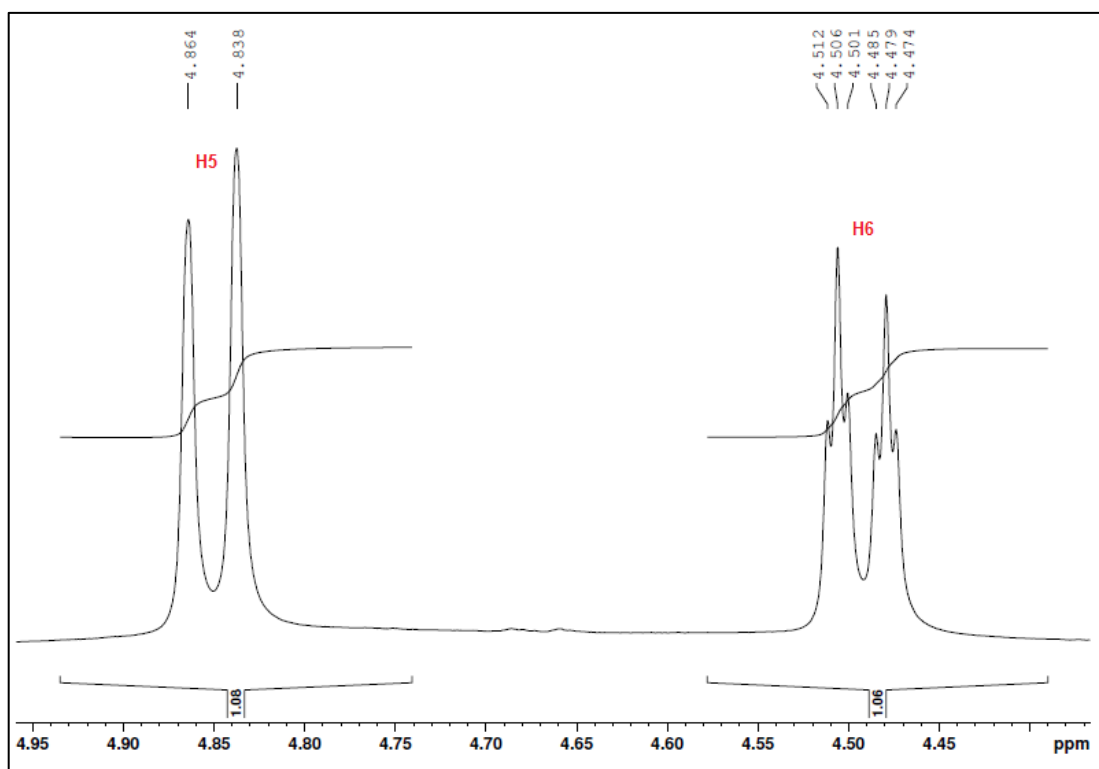


FIGURA 7- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H [400 MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1 (4,20 - 5,10 ppm).

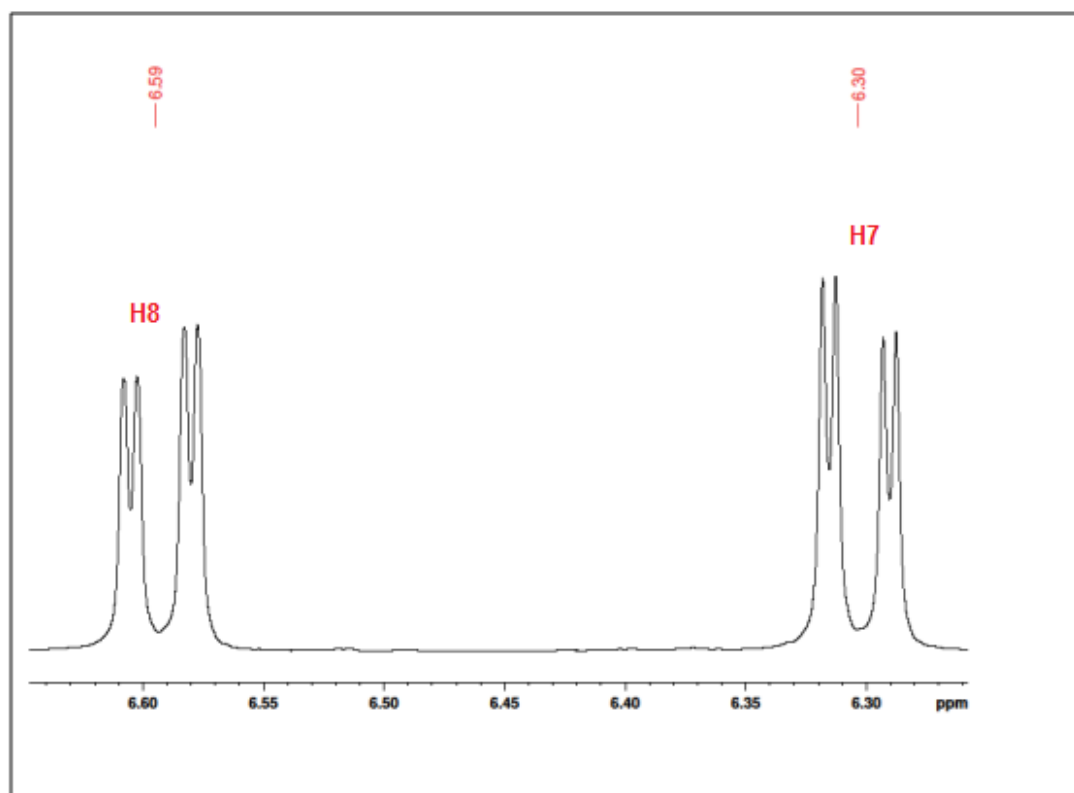


FIGURA 8- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H [400 MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1 (6,00 - 6,70 ppm).



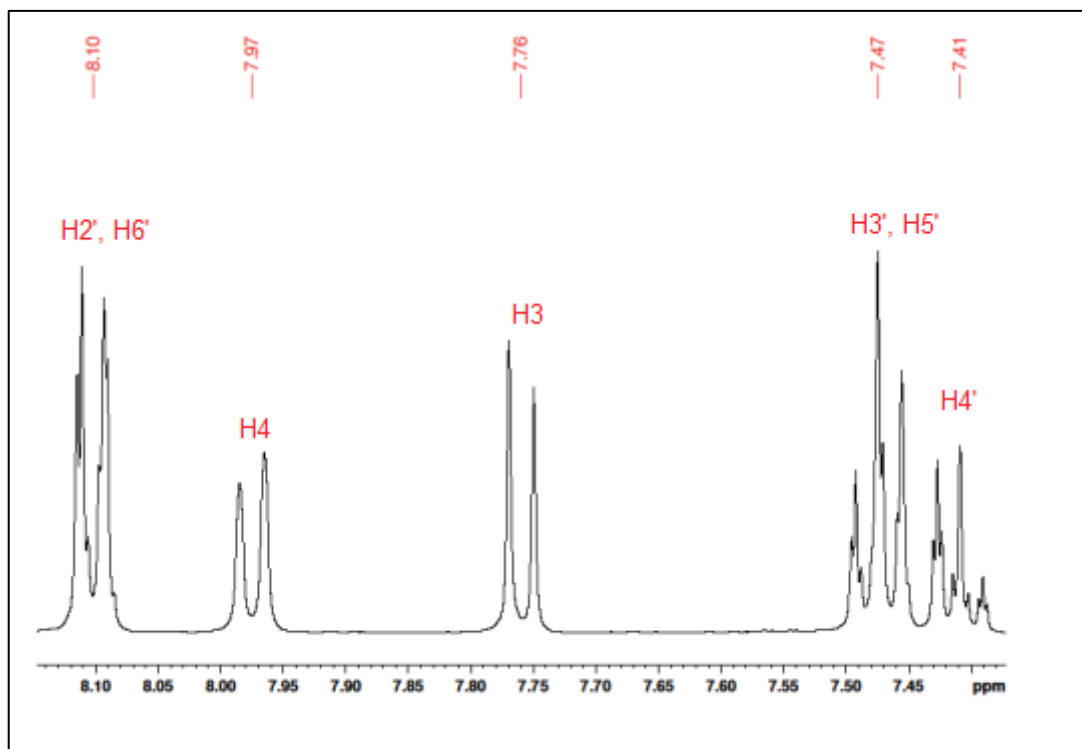


FIGURA 9- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN<sup>1</sup>H [400 MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1 (7,00 - 8,20 ppm).

A análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 10, 11 e 12) e DEPT 135 (Figura 13 e 14) demonstrou sinais de carbonos na região mais desblindada do espectro (100 a 160 ppm, correspondentes aos carbonos do DFQ1: C-2 (155,9), C-3 (119,2), C-4 (134,5), C-7 (138,1), C-8 (129,5), C-9 (152,5) C-10 (133,1), C-1' (140,1), C-2' (127,4), C-3' (129,4), C-4' (129,5), C-5' (129,4), C-6' (127,4 ppm. As duas posições modificadas da estrutura original da FQ que correspondem ao C-5 e C-6 apareceram como sinais em 74,9 ppm e 73,8 ppm, respectivamente, em região mais blindada do espectro, devido à presença das duas hidroxilas e à perda da aromaticidade do anel. As atribuições dos sinais no espectro de RMN <sup>13</sup>C e DEPT 135 de DFQ1 estão relacionados na Tabela 5.

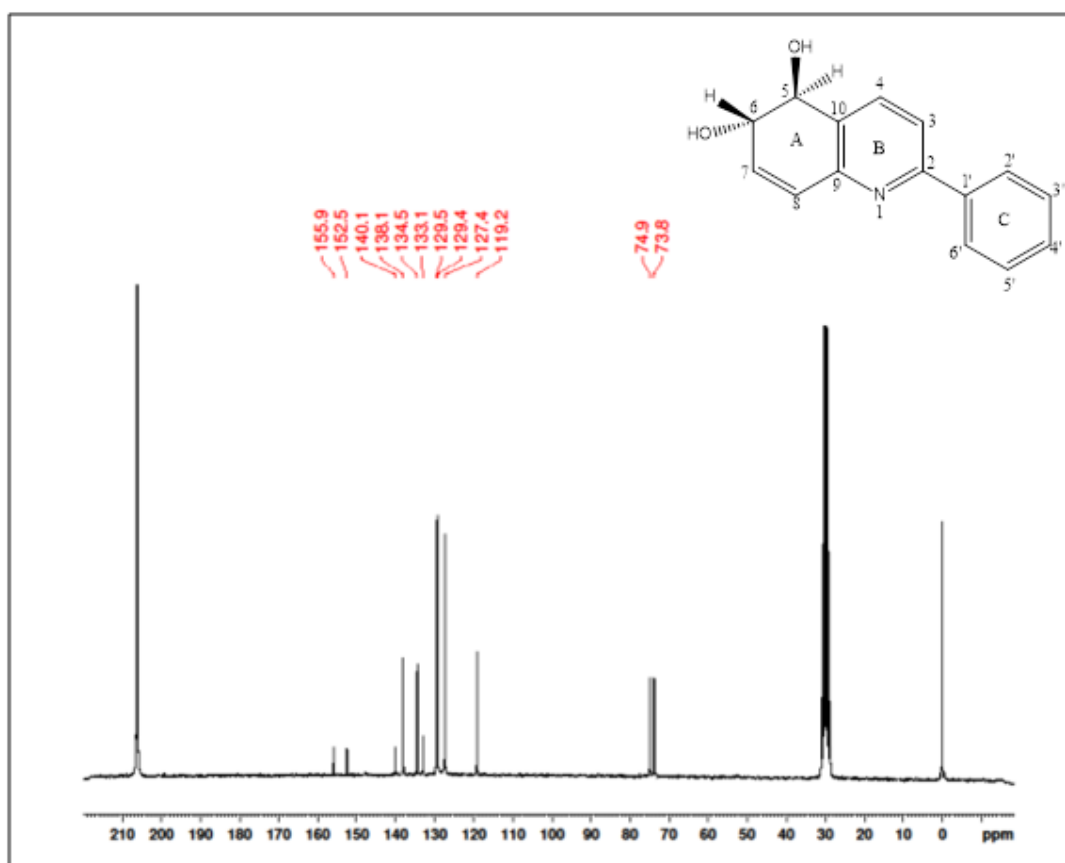


FIGURA 10- ESPECTRO DE RMN<sup>13</sup>C [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1.

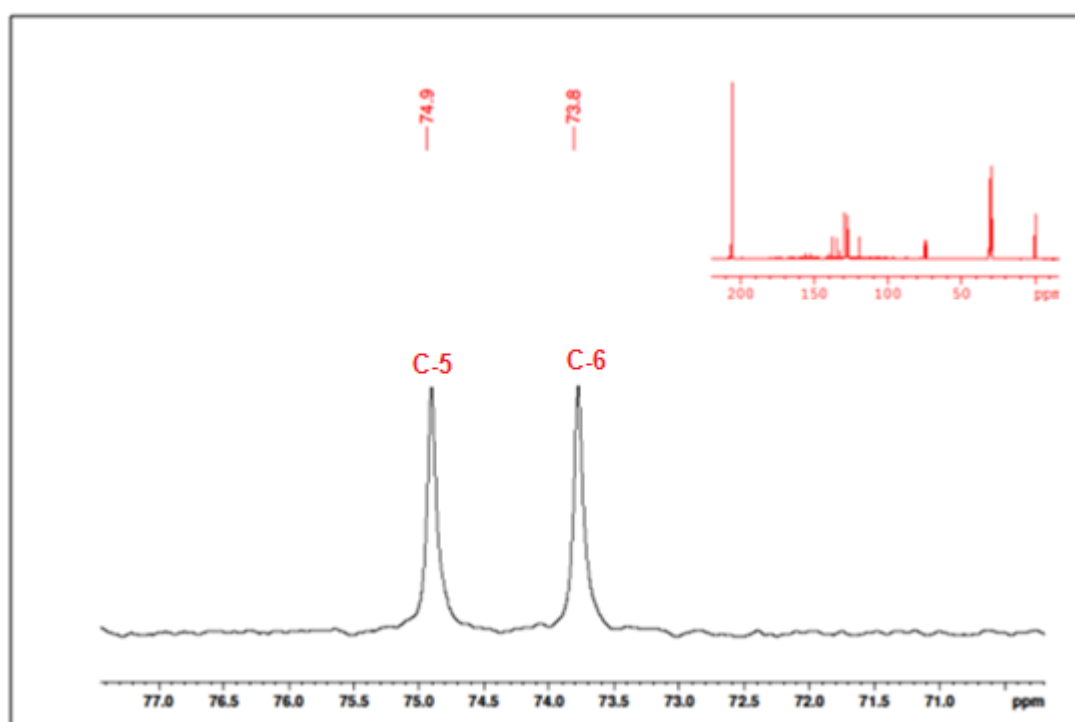


FIGURA 11- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN<sup>13</sup>C [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1 (70,0 - 77,0 ppm).

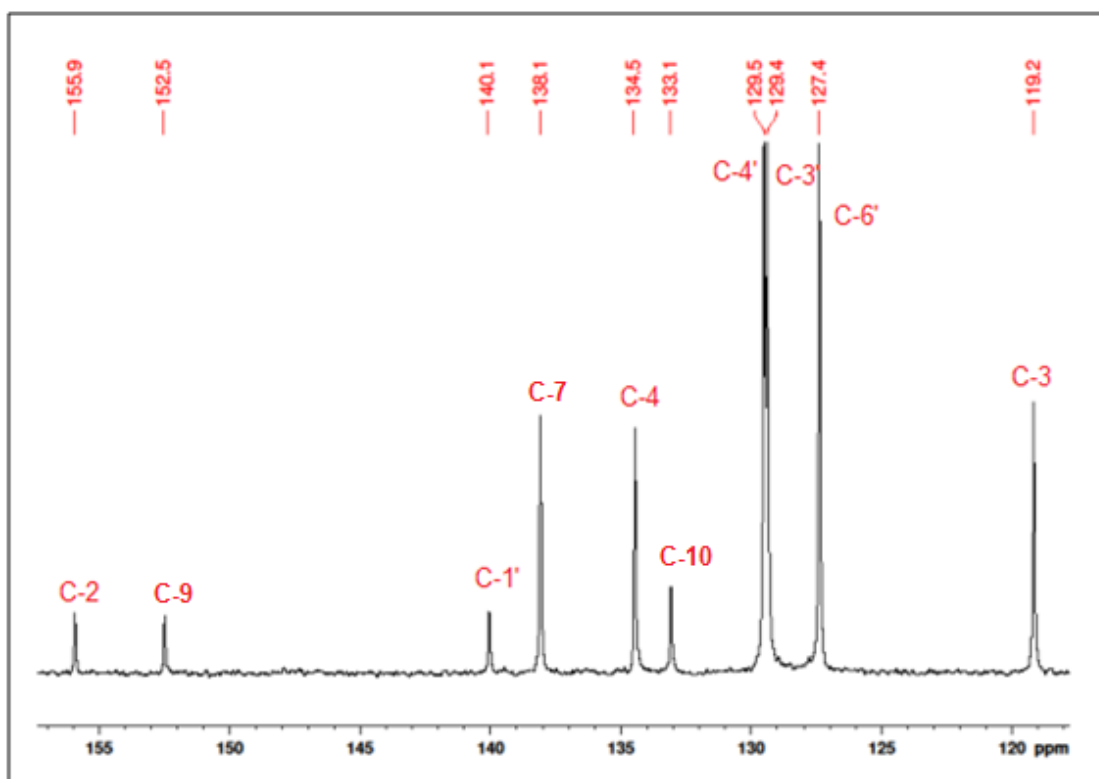


FIGURA 12- EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$  [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DO DFQ1 (110,0 - 157,0 ppm).

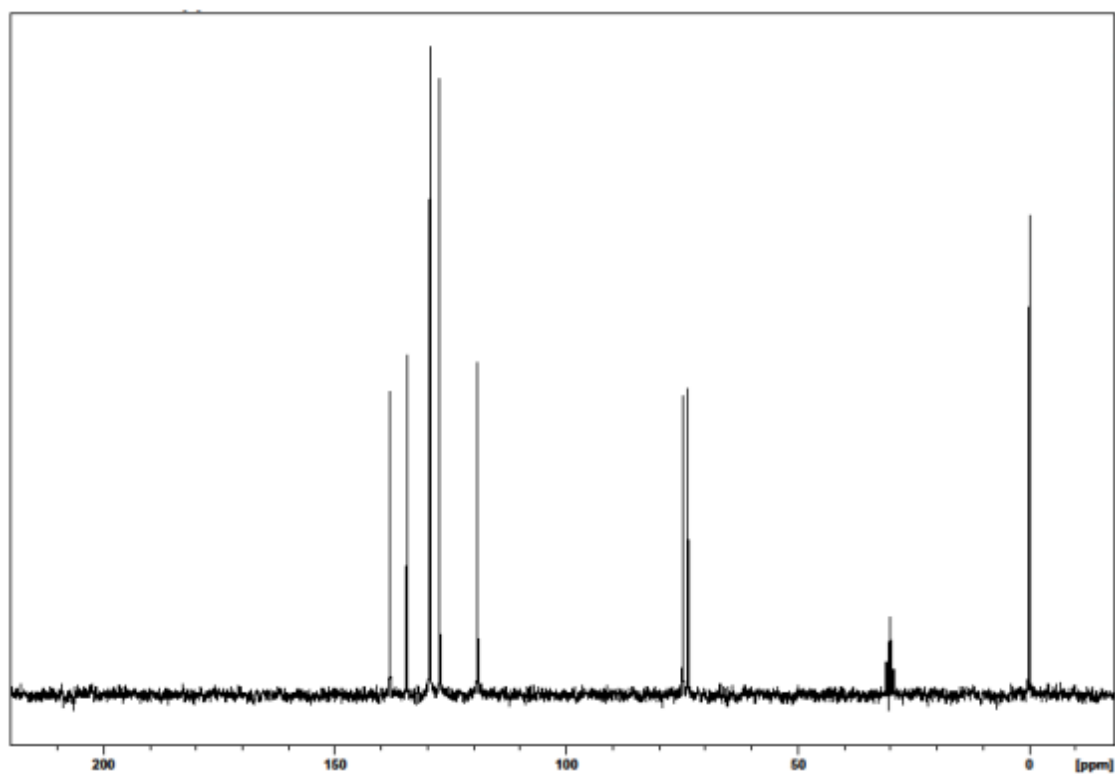


FIGURA 13- ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ1.

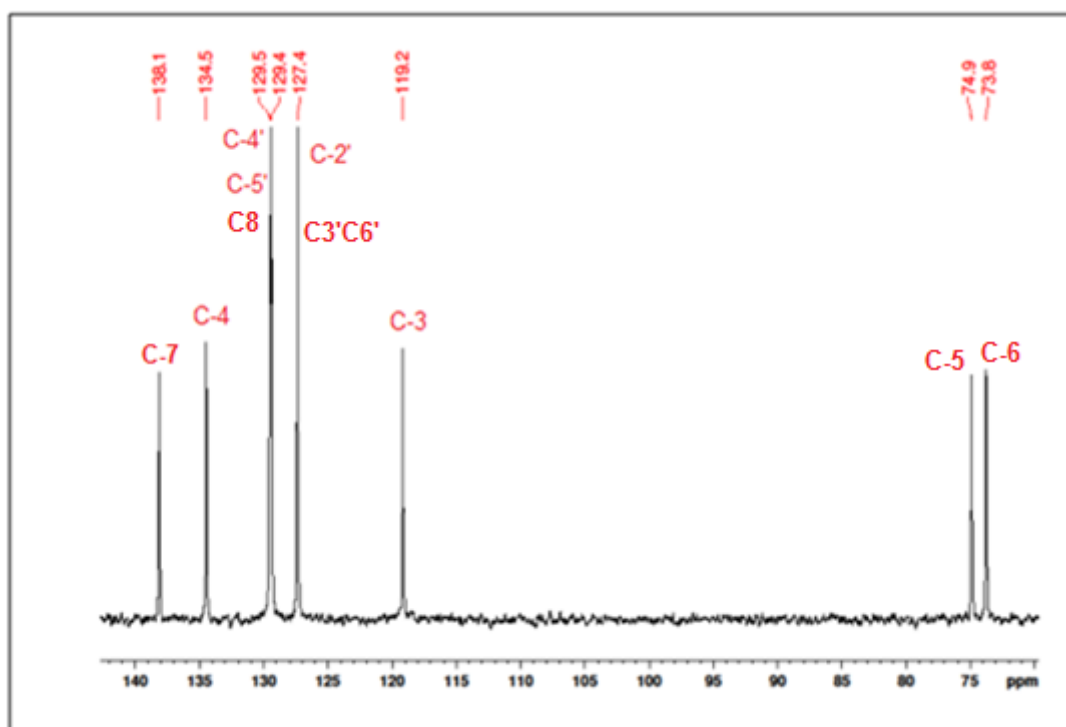


FIGURA 14- ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DE DFQ1 (70,0 - 145,0 ppm).

TABELA 5- DADOS DE RMN<sup>13</sup>C DO DERIVADO 1 DA FENILQUINOLINA OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO DA FENILQUINOLINA POR *Aspergillus fumigatus*.

C	δ (ppm)	DEPT 135
C-2	155,9	C
C-3	119,2	CH
C-4	134,5	CH
C-5	74,9	CH
C-6	73,8	CH
C-7	138,1	CH
C-8	129,5	CH
C-9	152,5	C
C-10	133,1	C
C-1'	140,1	C
C-2'	127,4	CH
C-3'	129,4	CH
C-4'	129,5	CH
C-5'	129,4	CH
C-6'	127,4	CH

NOTA: <sup>1</sup>[(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 100 MHz, ppm]

C- Carbono não hidrogenado

Com a análise do espectro de DEPT 135 (Figura 13 e 14) juntamente com o espectro de RMN<sup>13</sup>C foi possível caracterizar os 15 átomos de carbono do DFQ1 (Tabela 5).

A partir do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 16) foi possível detectar as correlações a curta distância, ou seja, correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados. A expansão do espectro entre 4,1 a 5,4 ppm (Figura 17 B) demonstrou as correlações entre o C-6 em 73,8 ppm com o hidrogênio em 4,50 ppm e o C-5 em 74,9 ppm com o hidrogênio em 4,86 ppm comprovando a modificação na estrutura da substância de partida (2-fenilquinolina). Correlações adicionais também puderam ser visualizadas na região de 6,20- 8,40 ppm (Figura 17 A): o C-3 em 119,2 ppm correlacionando com o H-3 em 7,76 ppm; o C-4 em 134,5 ppm com o H-4 em 7,97 ppm; o C-7 em 138,1 ppm com o H-7 em 6,30 ppm; o C-8 em 129,5 ppm com o H-8 em 6,59 ppm. As correlações encontradas no anel C foram o C-2' em 127,4 ppm com o H-2' em 8,10 ppm; o C-3' em 129,4 ppm com H-3' em 7,47 ppm; o C-4' em 129,5 ppm como o H-4' em 7,41 ppm; o C-5' em 129,4 ppm com o H-5' em 7,47 ppm e também o C-6' em 127,4 ppm com o H-6' em 8,10 ppm. Essas correlações são melhor visualizadas na Figura 15.

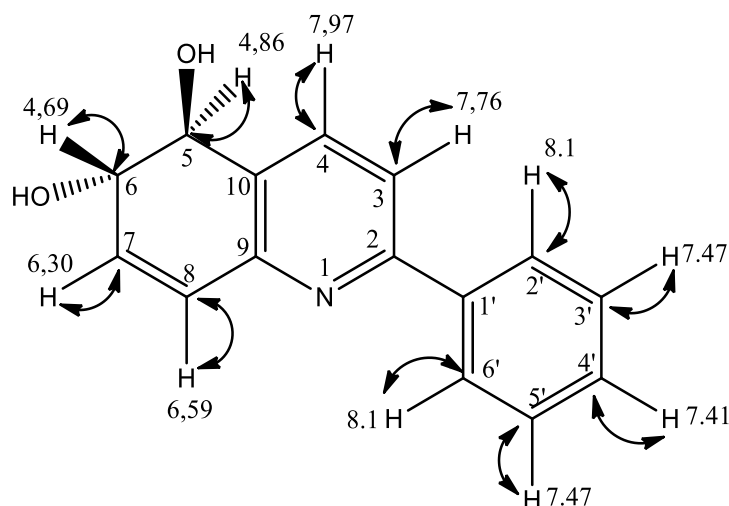


FIGURA 15- CORRELAÇÕES ENCONTRADAS NO ESPECTRO HSQC DE DFQ1.

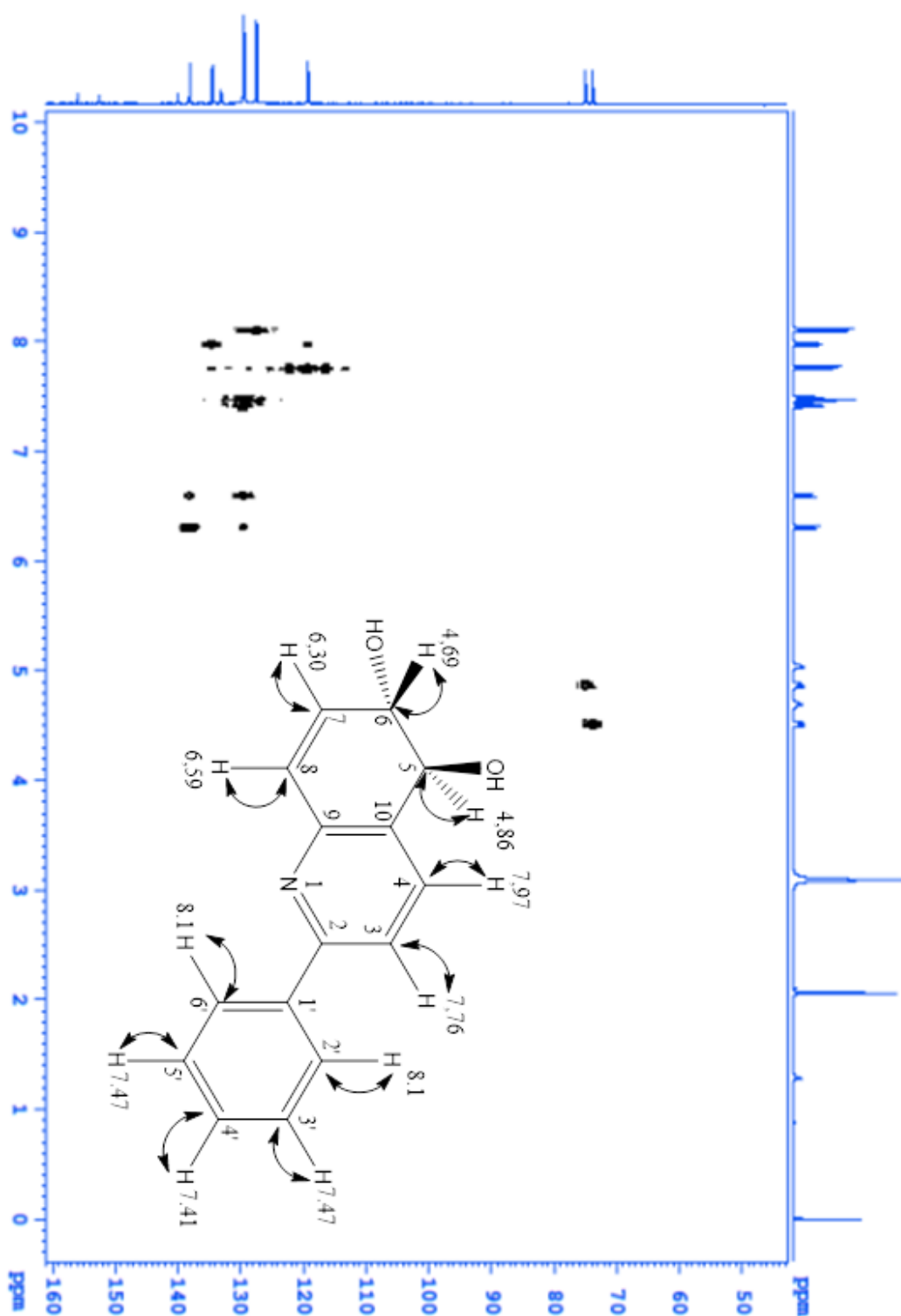


FIGURA 16- MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC, DE DFQ1 EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

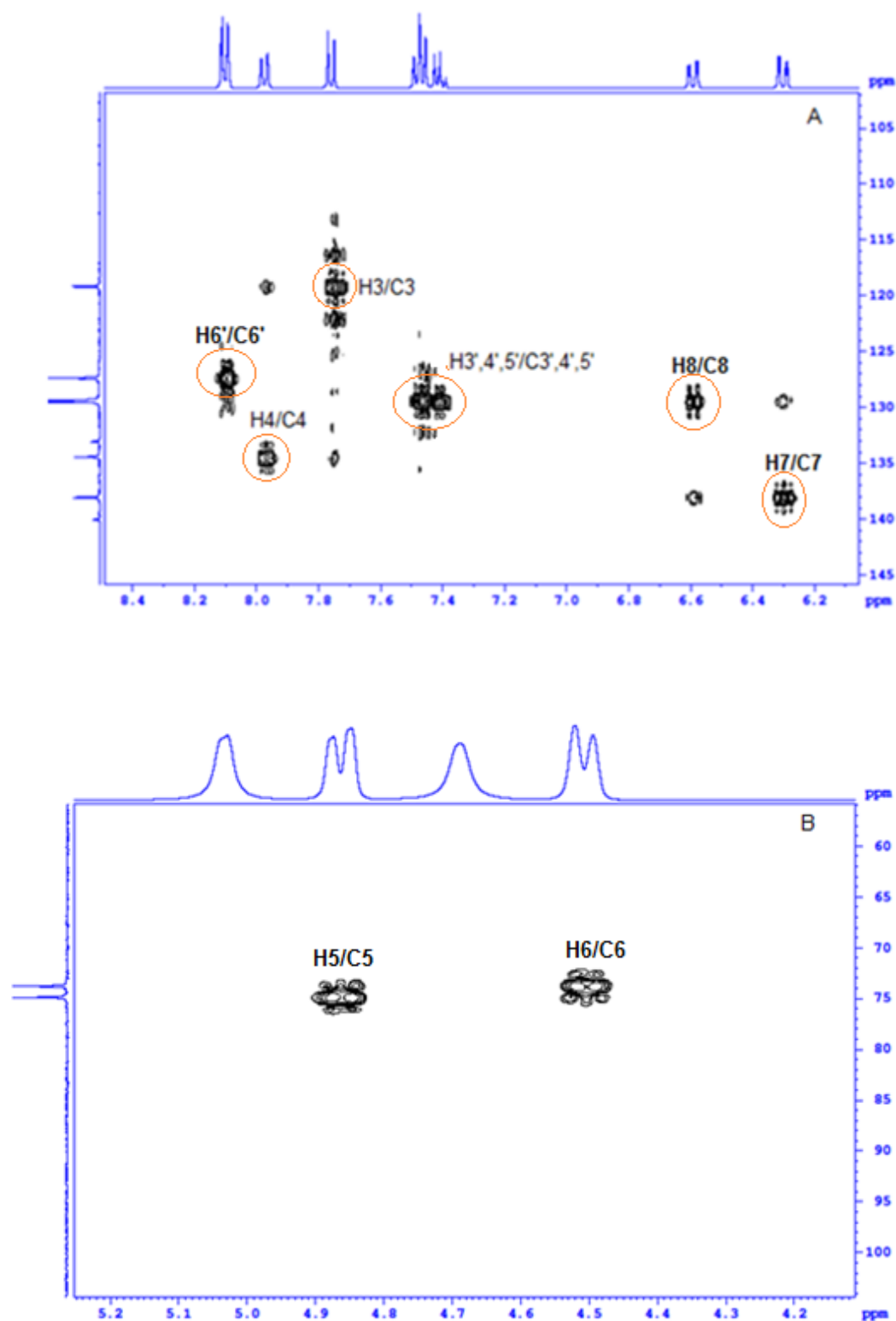


FIGURA 17- (A) EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DE DFQ1 ENTRE 6,2-8,4 PPM. (B) EXPANSÃO REGIÃO 4,1-5,2 ppm.

As correlações a longa distância HMBC (Figura 19) elucidaram a correta posição das duas hidroxilas inseridas no anel (A) como demonstrado pelas correlações do H-6 em 4,50 ppm com os carbonos: C-5 em 74,9 ppm, C-8 em 129,5 ppm, C-7 em 138,1 ppm (Figura 19 e 20A). As correlações referentes à presença da outra hidroxila na molécula foi o H-5 em 4,86 ppm correlacionando com o C-7 em 138,1 ppm, com o C-9 em 152,5 ppm, com o C-4 em 134,5 ppm, com o C-10 em 133,1 ppm e com o C-6 em 73,8 ppm (Figura 19 e 20A). As correlações entre 5,5-8,5 ppm estão demonstradas na Figura 19 e 20B. Todas as correlações observadas no mapa de correlação HMBC podem ser melhor visualizadas na Figura 18.

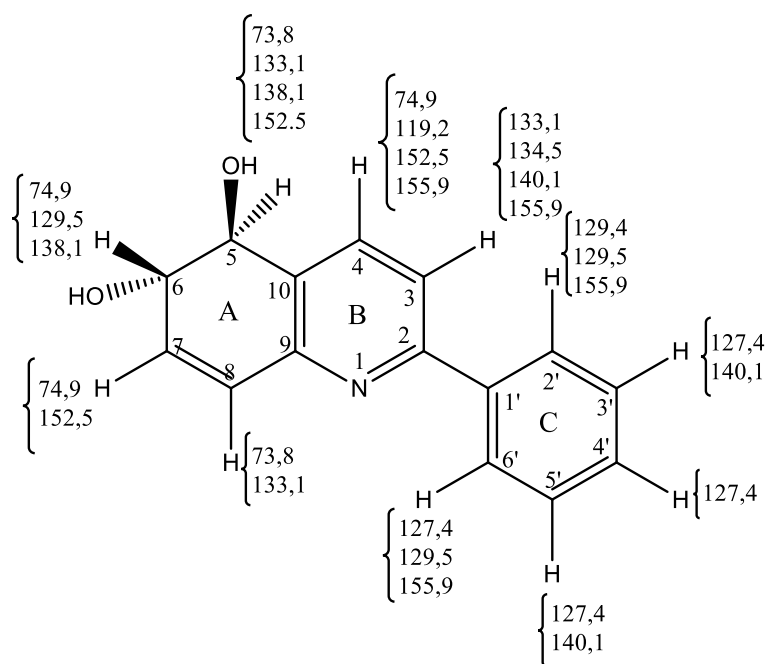


FIGURA 18- CORRELAÇÕES HMBC OBSERVADAS PARA DFQ1.



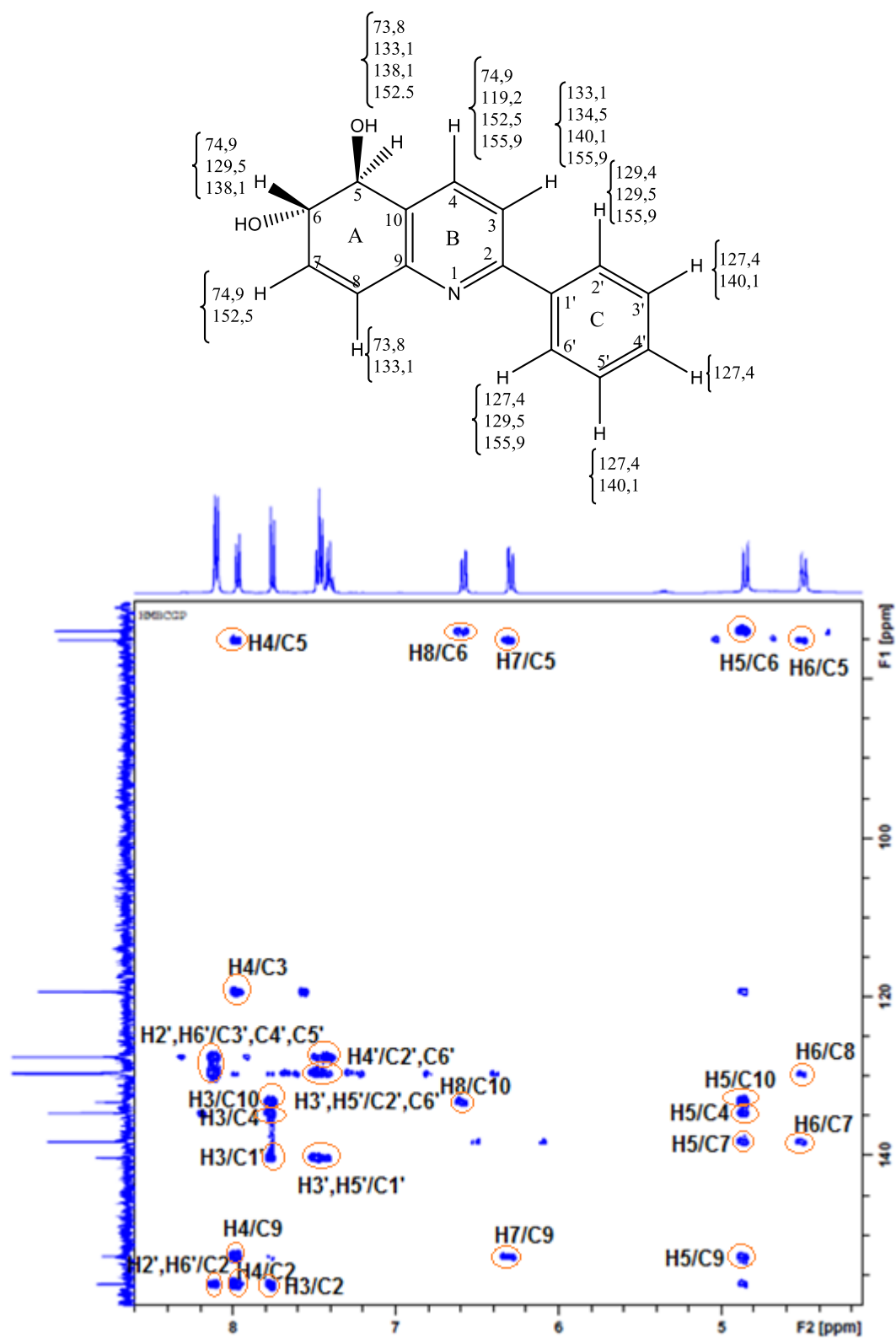


FIGURA 19- MAPA DE CORRELAÇÃO PARA DFQ1 EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

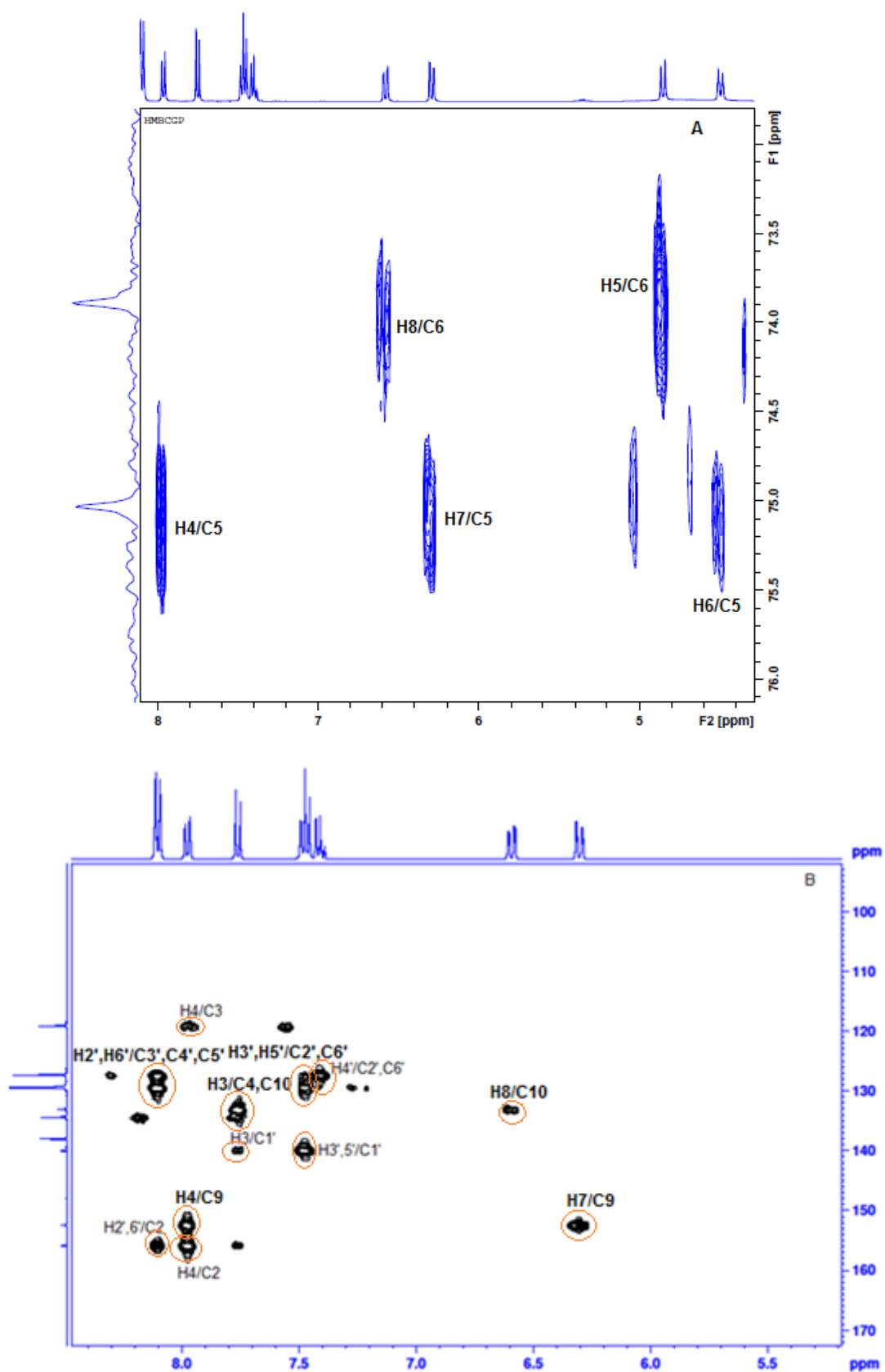


FIGURA 20- (A) EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC ENTRE 3,5-5,4 PPM. (B) EXPANSÃO ENTRE 5,5-8,5 ppm.

No mapa de correlação homonuclear COSY do DFQ1 (Figura 21), observou-se que o próton na posição 6 tem relação com os prótons nas posições 5, 7 e 8 (A e B). As correlações entre o H7/H8 e H-6 também foram observadas (C e D). As demais correlações foram evidenciadas (E, F, G e H).

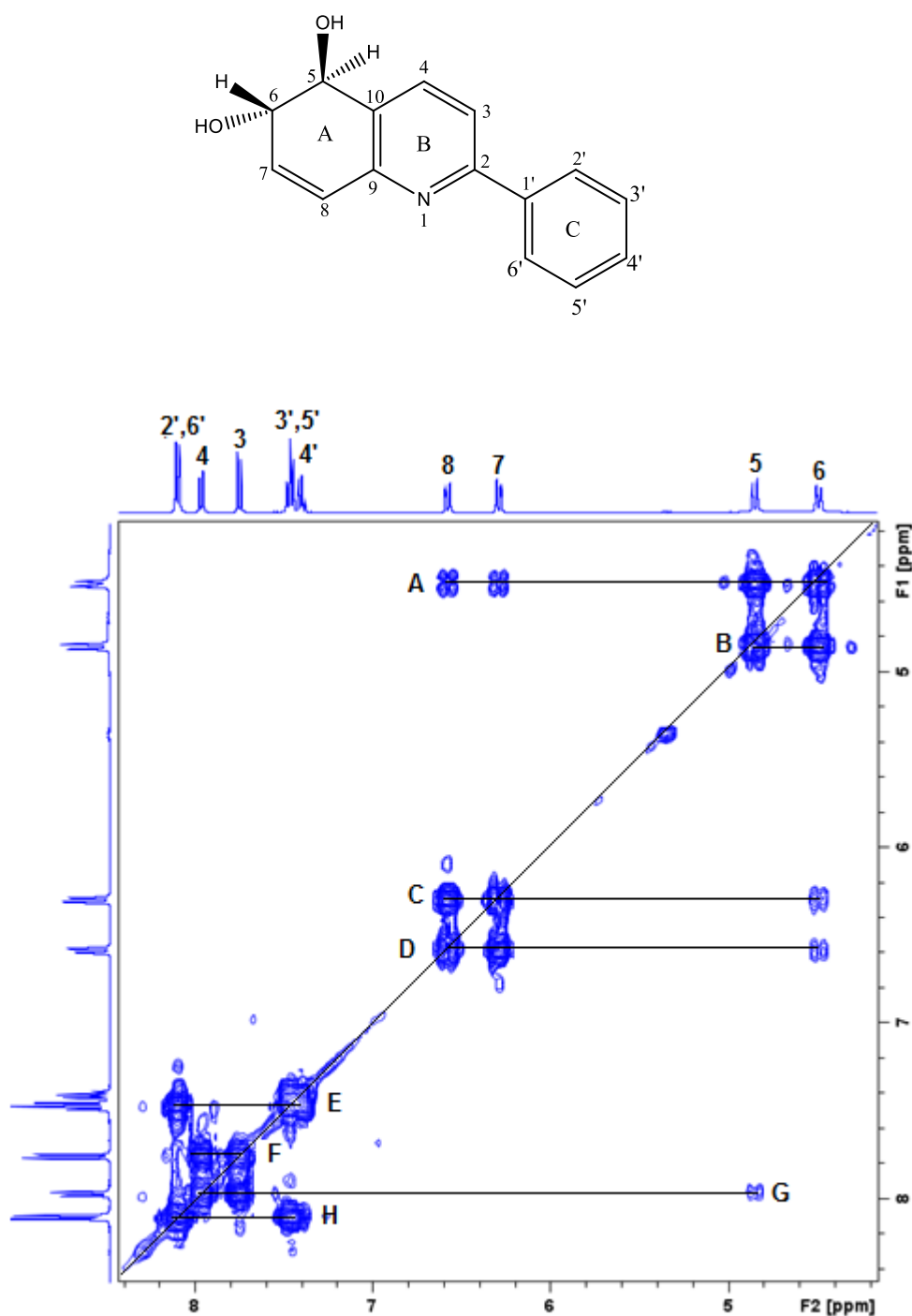


FIGURA 21- MAPA DE CORRELAÇÃO COSY PARA DFQ1 EM (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

Através do mapa de correlação de NOESY (Figura 22), confirmamos os núcleos de  $^1\text{H}$  que interagem entre si na molécula do DFQ1.

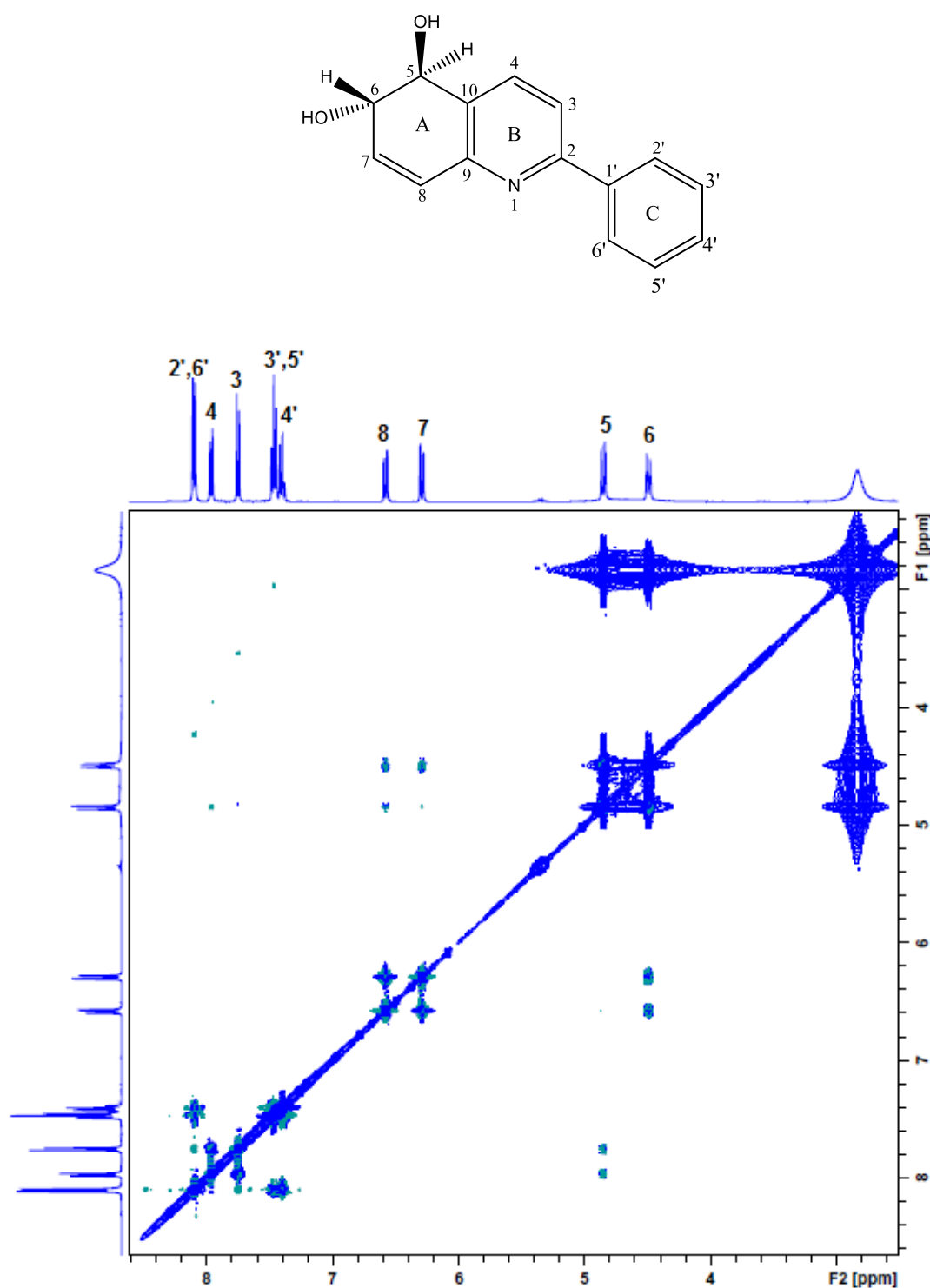


FIGURA 22- MAPA DE CORRELAÇÃO NOESY DE DFQ1 EM  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

Notoriamente os prótons nas posições 3 e 4 são os mais protegidos e através do mapa de correlação de NOESY ampliado na região de 7,7-8,2 ppm (Figura 23) foi possível observar o NOE do H-3 com os prótons *orto* fenílicos nas posições 2' e 6'.

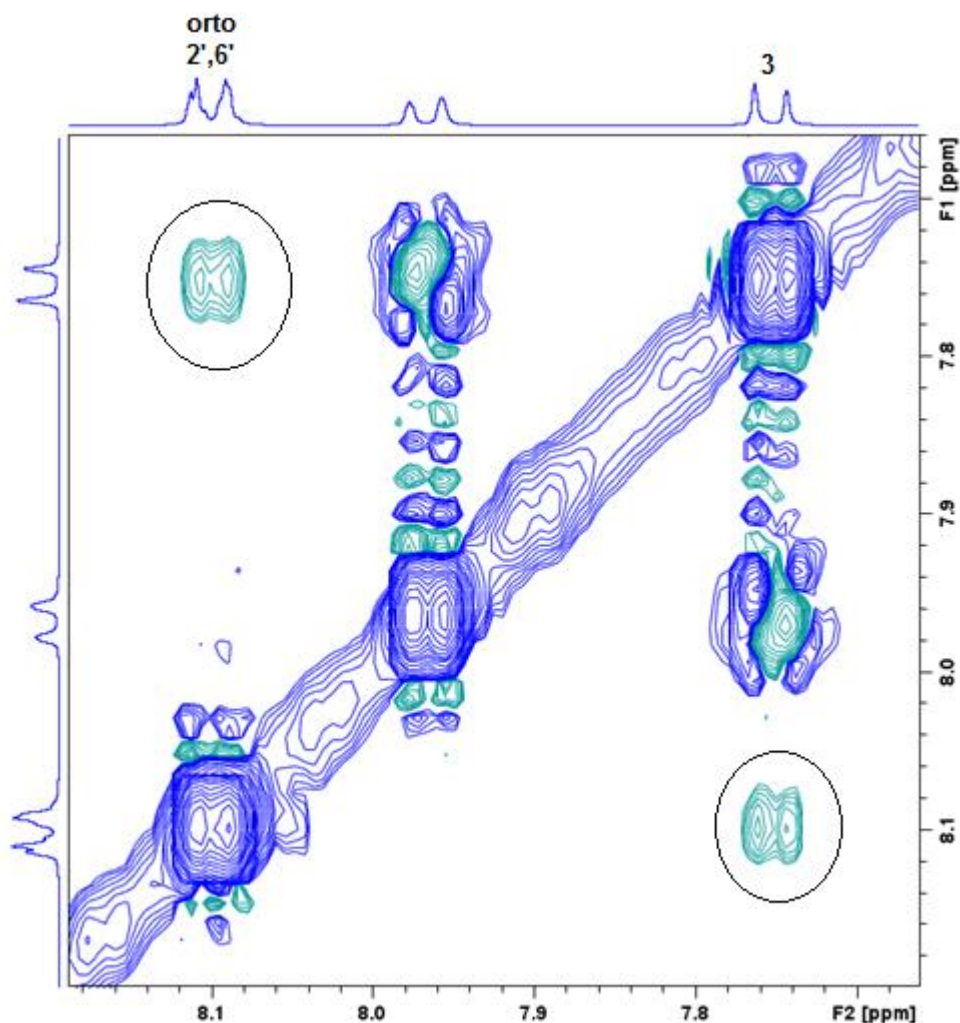


FIGURA 23- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE NOESY DE DFQ1 ENTRE 7,7-8,2 ppm.

A constante de acoplamento entre os prótons nas posições 5 e 6 foi grande ( $J = 10,69$  Hz), comprovando que eles se encontram em relação *trans*. Como existe acoplamento entre eles, o NOESY mostraria resíduos de COSY, como podemos visualizar na Figura 24. As correlações foram fragmentadas antifase. A excitação seletiva de cada  $H_5$  e  $H_6$  gera no outro sinais antifase.

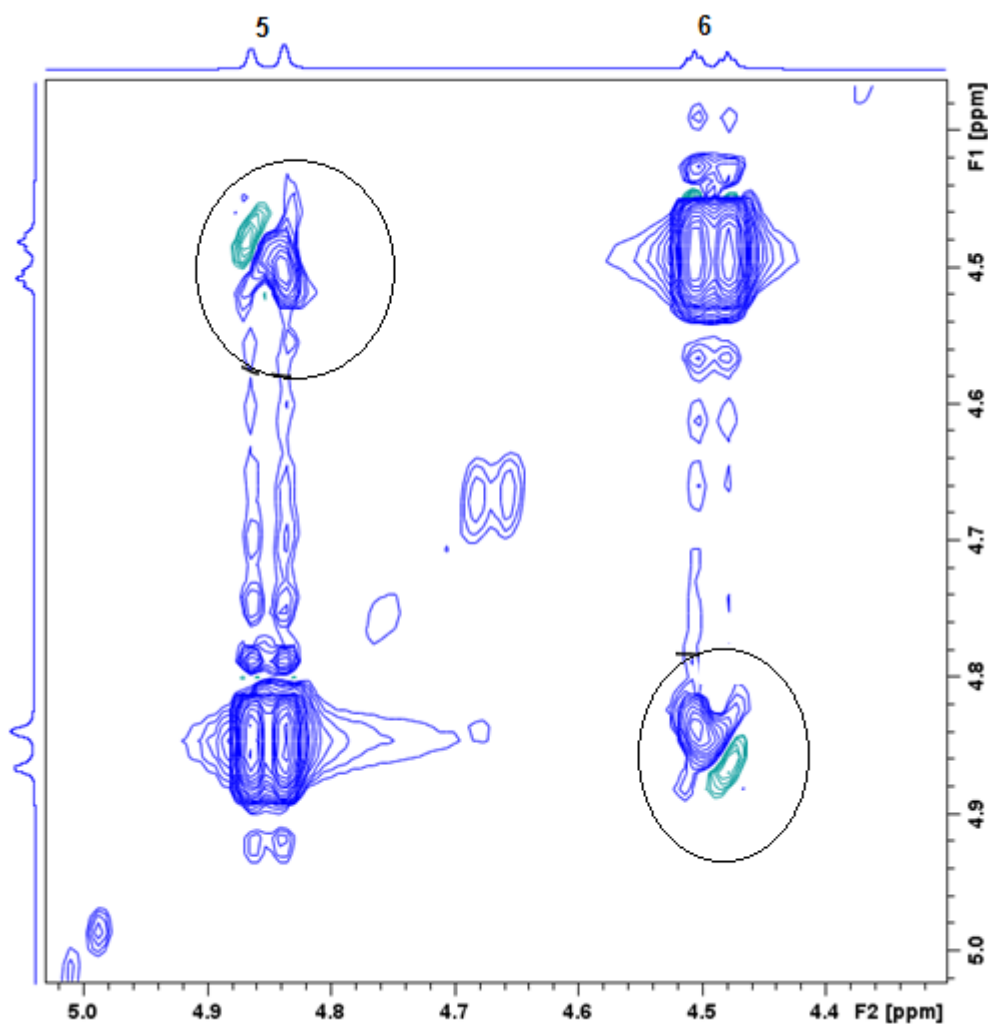
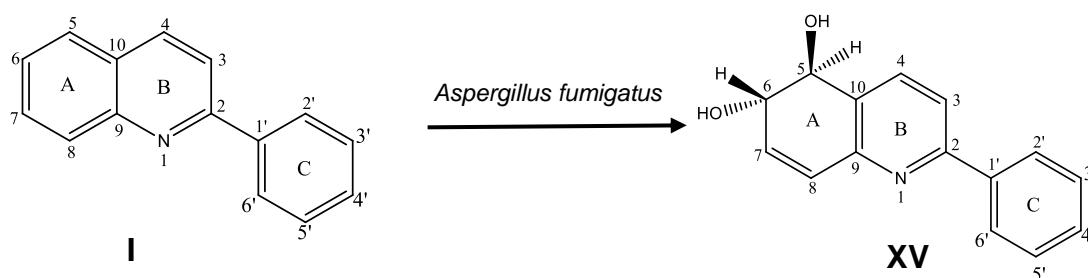


FIGURA 24- - EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE NOESY DE DFQ1 ENTRE 4,3-5,0 ppm.

Com todos esses dados e confirmando a estrutura proposta para (5S, 6S)-2-fenil-5,6-di-hidroquinolina-5,6-diol (DFQ1) ou (5R, 6R)-2-fenil-5,6-di-hidroquinolina-5,6-diol (DFQ1), verificou-se que ocorreu hidroxilações nas posições C-5 e C-6 do anel (A) da 2-fenilquinolina. Na literatura não foi encontrado relatos de hidroxilações nessas posições por reações de biotransformação ou através de síntese química, sendo, portanto, uma substância inédita.



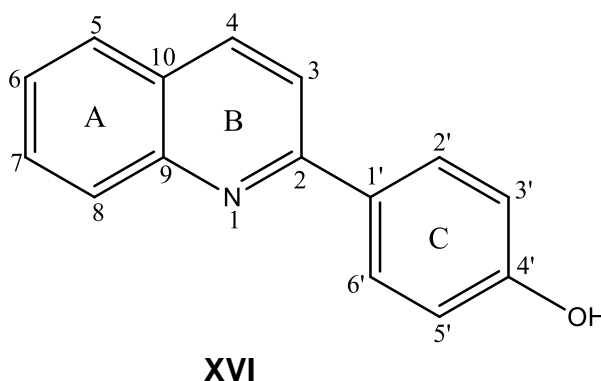
ESQUEMA 4- MODIFICAÇÕES NA 2-FENILQUINOLINA APÓS REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO *Aspergillus fumigatus*.

As biotransformações oxidativas envolvem normalmente um complexo enzimático conhecido como oxigenases, as quais catalisam a inserção de um (mono-oxigenases) ou dois átomos de oxigênio (dioxigenases) em um ponto específico da molécula, frequentemente com alta régio e estereoseletividade (FABER, 2011). Mono-oxigenases e dioxigenases são as enzimas chaves na completa mineralização de moléculas alifáticas e monoaromáticas, ou de um dos anéis de um sistema poliaromático. Entretanto, hidrocarbonetos poliaromáticos são alvos de ataque de enzimas mono-oxigenases microbianas, onde a atividade destas enzimas resulta na formação de um epóxido, o qual é um intermediário altamente reativo. Epóxidos, por sua vez, podem ser transformados em dióis, através da ação de epóxidos hidrolases microbianas (SIMÕES, 2009).

A biotransformação da 2-fenilquinolina no derivado DFQ1 sugere a participação de enzimas mono-oxigenases e epóxido hidrolases presentes no sistema enzimático do fungo *A. fumigatus*. Porém estudos mais aprofundados são necessários para a comprovação real das enzimas responsáveis pelo processo de derivatização ocorrido.

#### 4.2.2 Caracterização do metabólito obtido por biotransformação da 2-fenilquinolina com o fungo *Aspergillus flavus*

O processo de biotransformação da FQ pelo fungo *A. flavus* levou à formação do derivado DFQ2 (XVI), um sólido branco amarelado e amorfo. Esse derivado foi analisado por CCD (HEX: AcOEt, 60:40), mostrando fluorescência quando submetida à luz UV e tornou-se alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de uma substância nitrogenada. Faixa de fusão: 237-238°C.



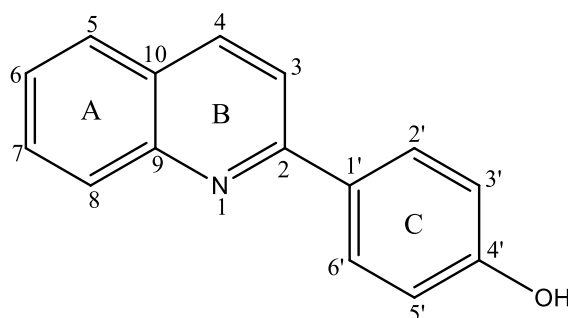
O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  222,03  $[M-H]^+$ , correspondendo a massa 221 Da, para um composto com fórmula molecular  $C_{15}H_{11}NO$ .

Através do espectro de RMN  $^1H$  (Figuras 25 A e B) foi possível observar os sinais característicos da substância DFQ2. A expansão do espectro de RMN  $^1H$  na região de 7,00 a 7,80 ppm (Figura 26 A) mostrou a presença um duplete duplo em 7,01 ppm correspondente aos hidrogênios ligados nas posição 3' e 5' cujos sinais apareceram como dupletos duplos devido aos acoplamentos com os hidrogênios vizinhos (H-2' e H-6'). Foi possível também na mesma expansão observar dois tripletos em 7,55 ppm (H-6) e em 7,75 ppm (H-7) devido aos acoplamentos com os hidrogênios vizinhos H-5 e H-8. Já na expansão do espectro na região entre 7,90 a 8,35 ppm (Figura 26 B) foi possível observar dois dupletos em 7,93 e 8,08 ppm referentes aos



hidrogênios nas posições 8 e 5 do anel A; outros dois dupletos em 8,03 e 8,35 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4 do anel B, que acoplam entre si. O duplete duplo em 8,17 ppm corresponde aos hidrogênios H-2' e H-6' localizados no anel C, devido aos acoplamentos com os hidrogênios vizinhos H-3' e H-5'. Não foi verificada a presença de sinal que pudesse ser atribuído ao H-4' presente na FQ, indicando que houve alteração nesta posição.

Na tabela 6 estão relacionados os sinais dos hidrogênios de DFQ2 e FQ, nos espectros de RMN<sup>1</sup> H, para fins de comparação.



**XVI**

TABELA 6- DADOS DE RMN<sup>1</sup> H DE DFQ2 OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO PELO FUNGO *Aspergillus flavus* E DA 2-FENILQUINOLINA

H	$\delta^1$ (ppm)	$\delta^2$ (ppm)
H-3	8,03 (d, J= 8,70 Hz)	8,08 (d, J= 8,6 Hz)
H-4	8,35 (d, J= 8,70 Hz)	8,37 (d, J= 8,6 Hz)
H-5	8,08 (d, J= 8,55 Hz)	7,94 (d, J= 8,2 Hz)
H-6	7,55 (t, (t, J= 7,50 Hz))	7,70-7,80 (m)
H-7	7,75 (t, (t, J= 7,50 Hz))	7,77 (t, J= 7,04 Hz)
H-8	7,93 (d, J= 8,20Hz)	8,12 (d, J= 8,6 Hz)
H-2', H-6'	8,17(dd, J= 2,15 e J= 8,84 Hz)	8,31 (dd, J= 1,5; J= 8,5 Hz)
H-3', H-5'	7,01 (dd, J= 2,15 e J= 8,84 Hz)	7,45-7,60 (m)

NOTA:<sup>1</sup>Dados experimentais do DFQ2, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400 MHz

<sup>2</sup>Dados experimentais da FQ, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400 MHz

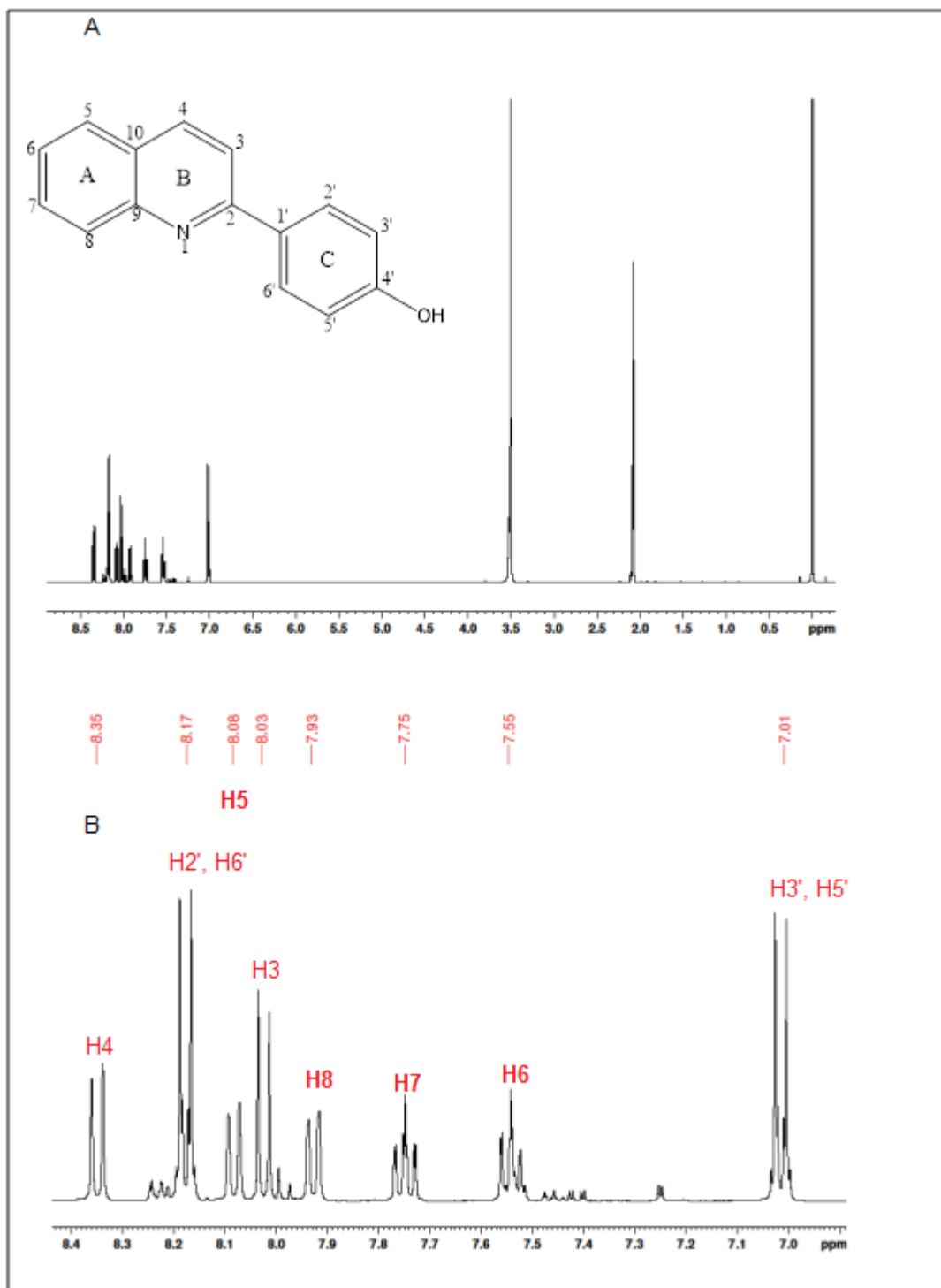


FIGURA 25- (A) ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  [400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ], DE DFQ2. (B) EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 7,00 A 8,40 ppm.

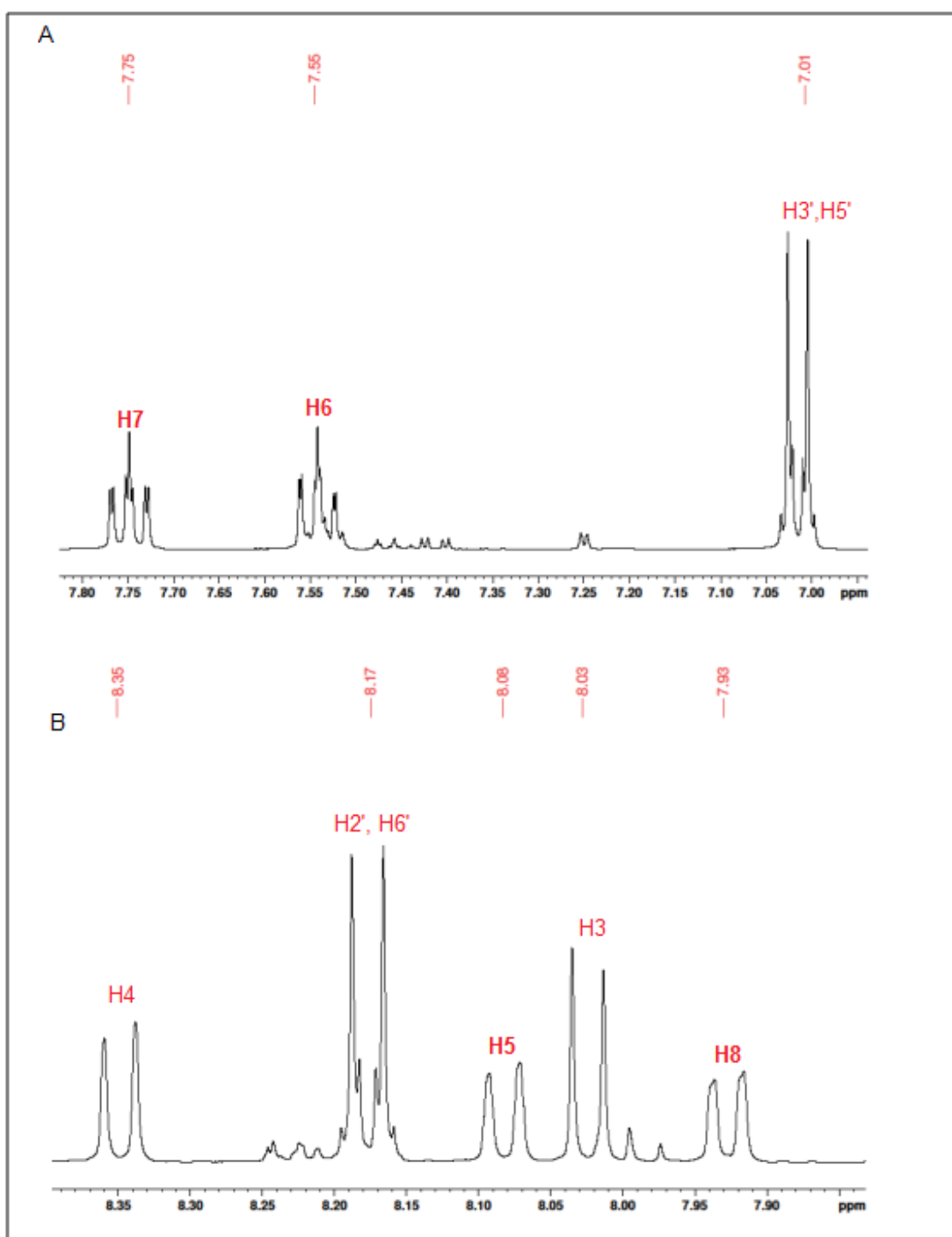


FIGURA 26- (A) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  [400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2 NA REGIÃO ENTRE 7,00 E 7,80 ppm. (B) EXPANSÃO NA REGIÃO ENTRE 7,90 E 8,35 ppm.

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 27 e 28) e DEPT 135 (Figura 29) demonstrou 15 carbonos aromáticos foram detectados como sinais em região mais desblindada do espectro (100 a 160 ppm), correspondentes aos carbonos do DFQ2: C-2 (156,8 ppm), C-3 (118,3 ppm), C-4 (136,8 ppm), C-5 (129,1 ppm), C-6 (127,7 ppm), C-7 (129,6 ppm), C-8 (125,9 ppm), C-9 (148,2 ppm), C-10 (127,0 ppm), C-1' (130,6 ppm), C-2' (128,9 ppm), C-3' (115,7 ppm), C-5' (115,7 ppm) e C-6' (128,9 ppm). A posição modificada da estrutura original da FQ que corresponde ao (C-4') aparece como sinal em C-4' (159,3 ppm), sendo que a modificação proposta foi à inserção de uma hidroxila nesta posição. Este sinal não foi observado no espectro de DEPT 135, evidenciando a ausência de H nesta posição.

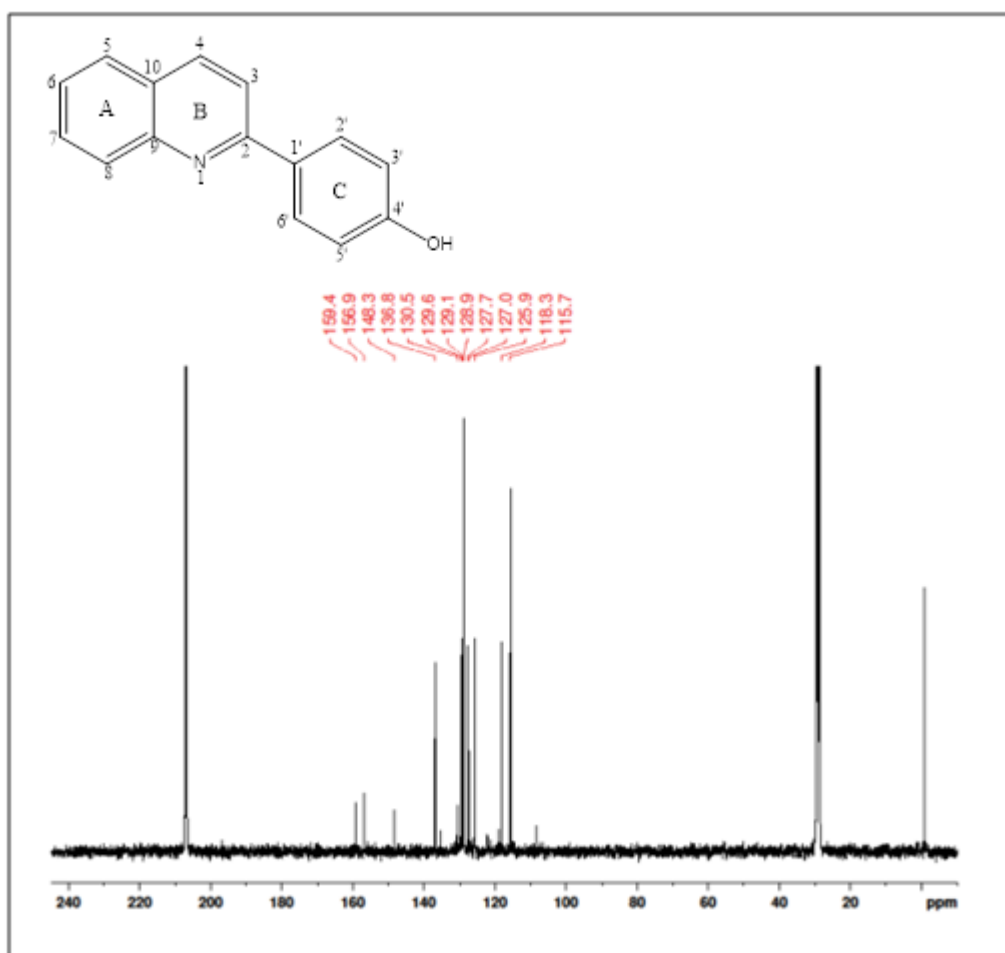


FIGURA 27- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2.

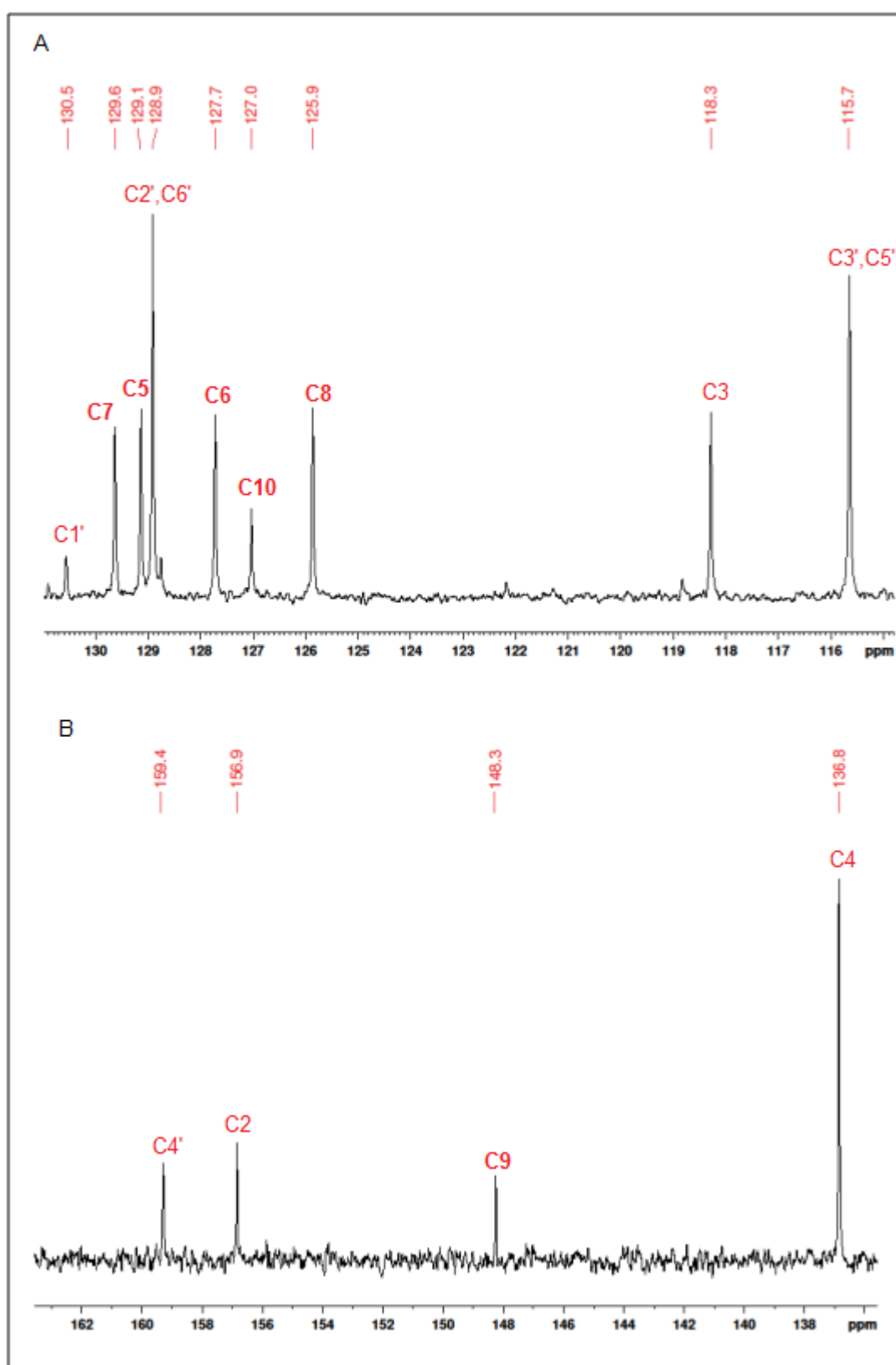


FIGURA 28- (A) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2 NA REGIÃO ENTRE 115,0 A 130,0 PPM. (B) EXPANSÃO DO ESPECTRO DE NA REGIÃO ENTRE 135,0 A 162,0 PPM.

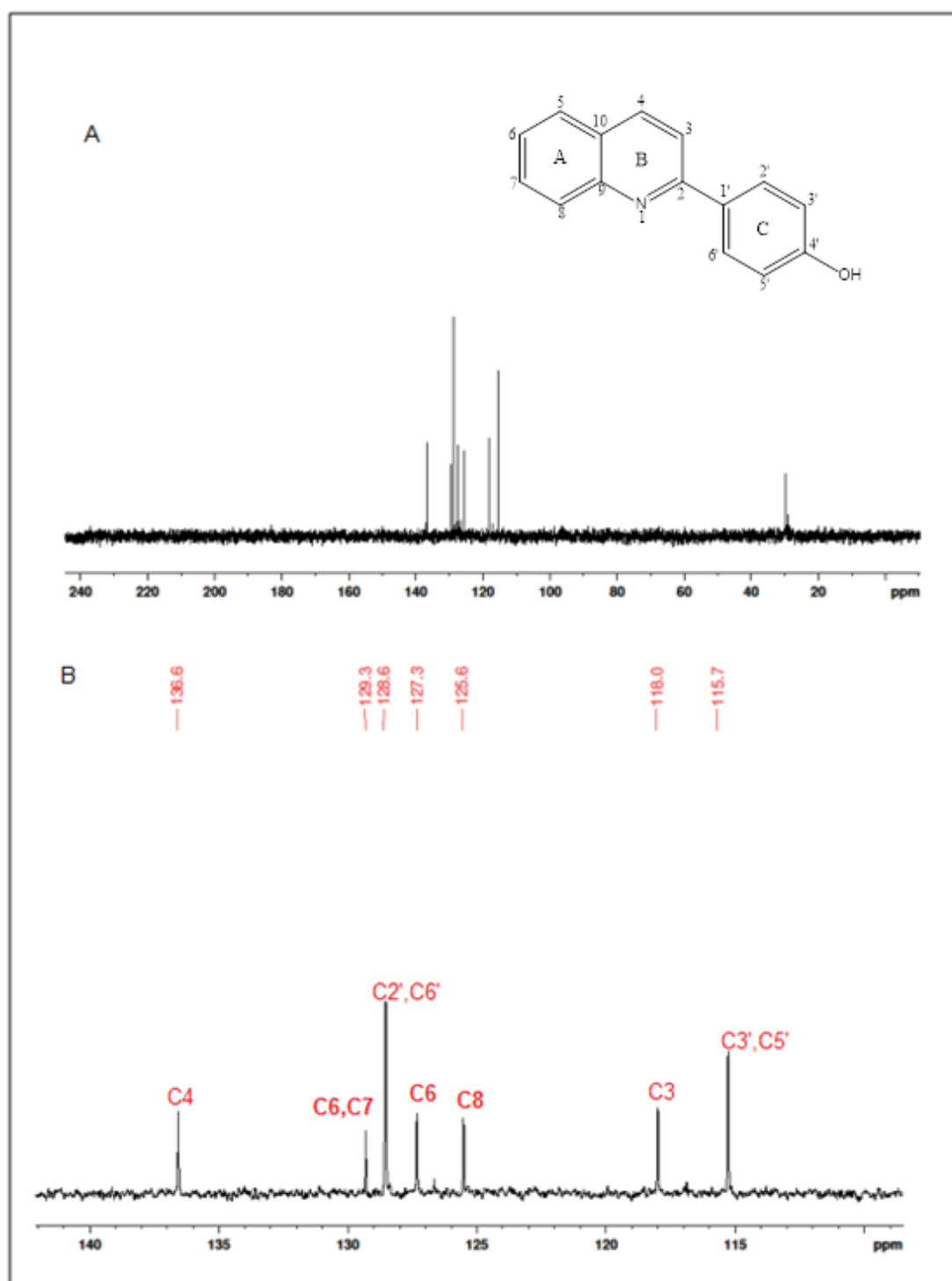
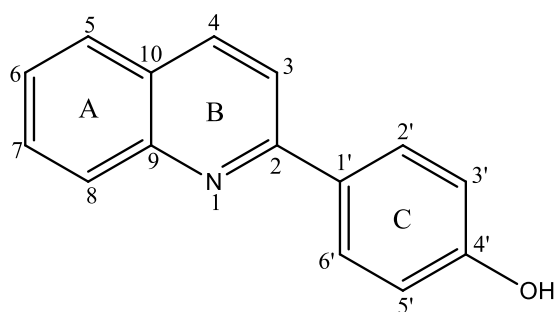


FIGURA 29- (A) ESPECTRO DE DEPT 135 [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DE DFQ2. (B) EXPANSÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO ENTRE 110,0 A 140,0 PPM.



XVI

TABELA 7- DADOS DE RMN  $^{13}\text{C}$  E DEPT 135 DE DFQ2 OBTIDO POR BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO *A. flavus*

C	$\delta$ (ppm)	DEPT135
C-2	156,8	C
C-3	118,3	CH
C-4	136,8	CH
C-5	129,1	CH
C-6	127,7	CH
C-7	129,6	CH
C-8	125,9	CH
C-9	148,2	C
C-10	127,0	C
C-1'	130,6	C
C-2'	128,9	CH
C-3'	115,7	CH
C-4'	159,3	C
C-5'	115,7	CH
C-6'	128,9	CH

NOTA:  $^1(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100 MHz

Com a análise do espectro de DEPT 135 (Figura 29) juntamente com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , foi possível caracterizar os 15 átomos de carbono do DFQ2 (Tabela 7).

A partir do mapa de correlação HSQC (Figura 31) foi possível detectar as correlações a curta distância ( $^1\text{J}$ ), ou seja, correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados. Na expansão entre 6,7 a 8,6 ppm observou-se as correlações entre o C-3' e C-5' em 115,5 ppm com o hidrogênio em 7,00 ppm e o C-6' e C-2' em 128,9 ppm com o hidrogênio em 8,17 ppm. Todas as correlações encontradas no espectro de HSQC estão demonstradas na Figura 30.

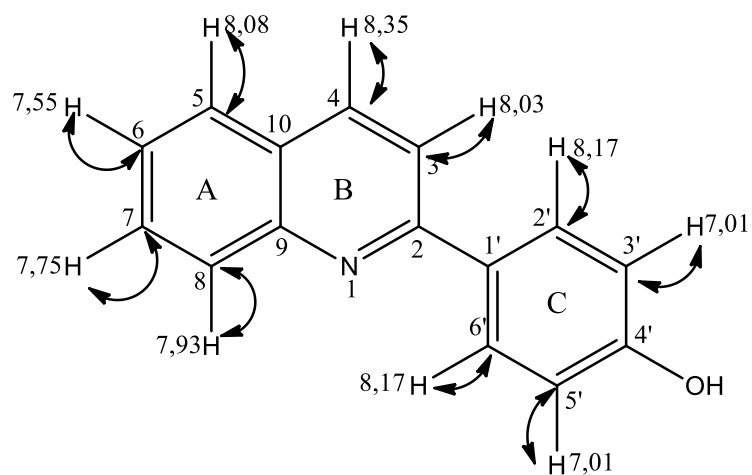


FIGURA 30- CORRELAÇÕES ENCONTRADAS NO MAPA HSQC DE DFQ2.

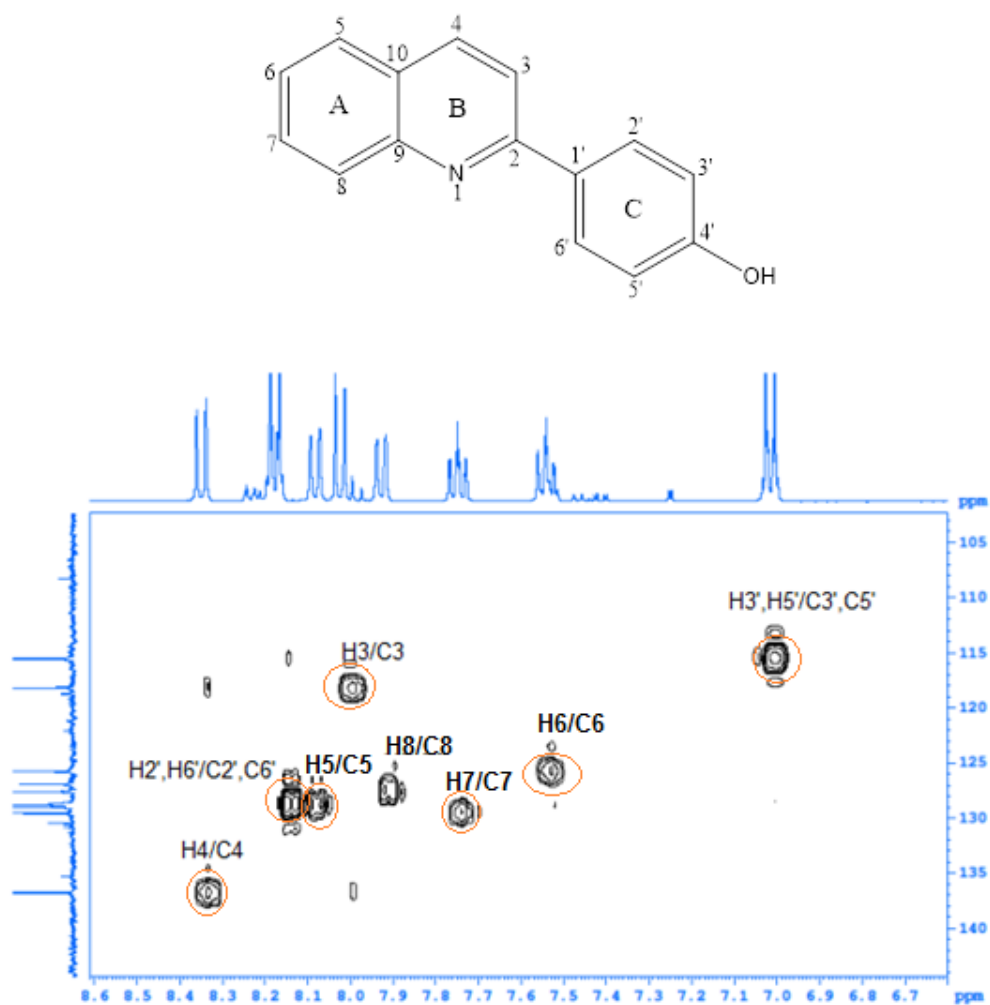


FIGURA 31- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC DE DFQ2 ENTRE 6,7-8,6 ppm.



As correlações a longa distância ( $^3J$ ) HMBC (Figura 33) comprovaram a correta posição da única hidroxila inserida no anel (C) como demonstrado pelas correlações fortes do H-2' e H-6' em 8,17 ppm com os carbono C-4' em 159,3 ppm. Todas as demais correlações observadas no espectro de HMBC podem ser melhor visualizadas na Figura 32.

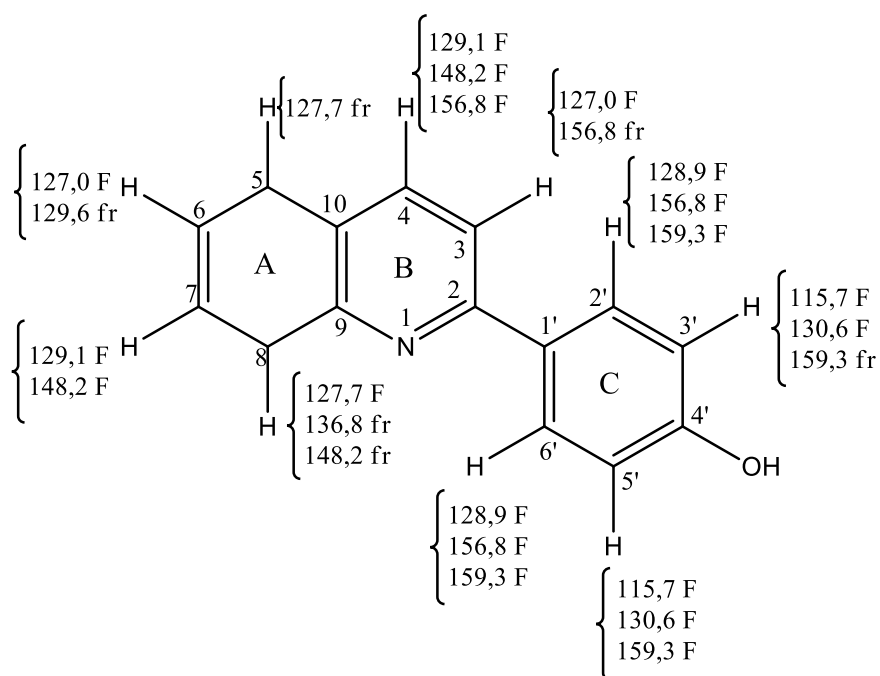


FIGURA 32- CORRELAÇÕES HMBC OBSERVADAS PARA DFQ2.

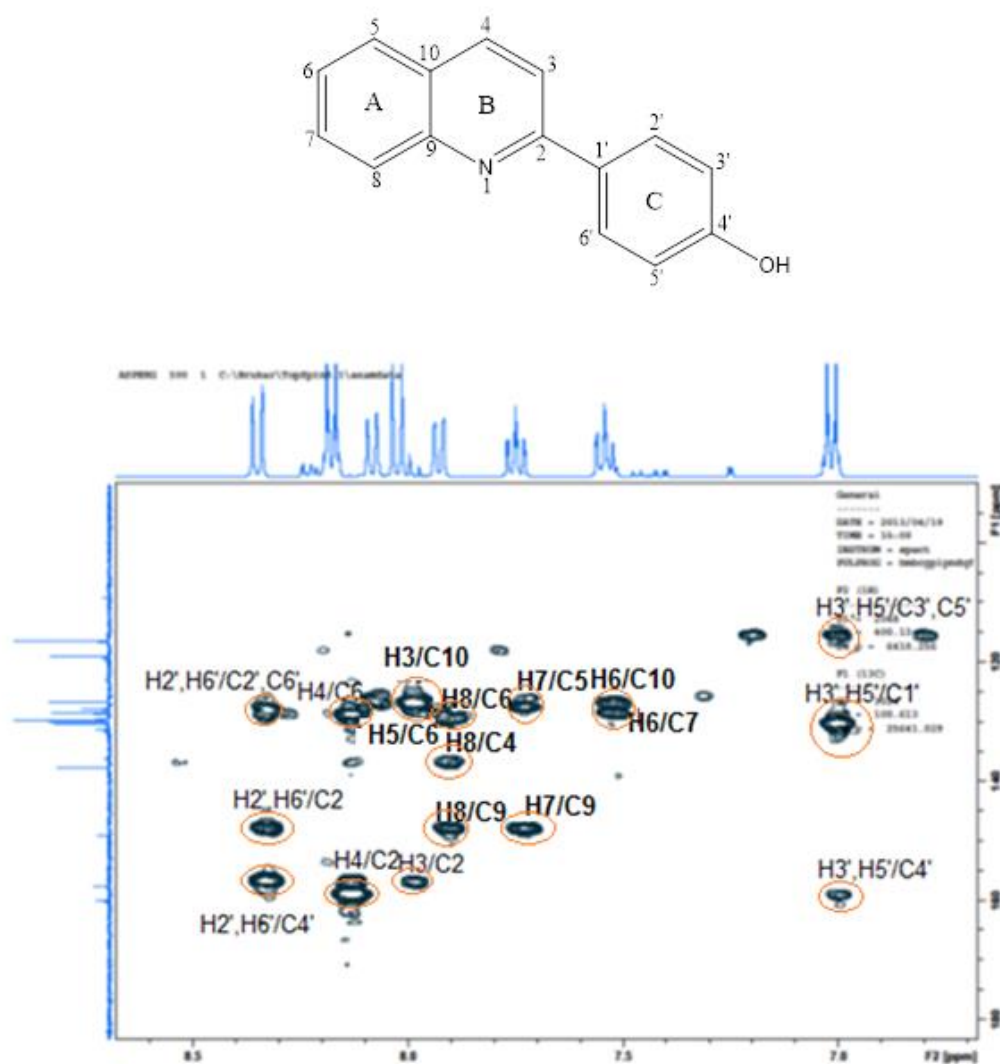
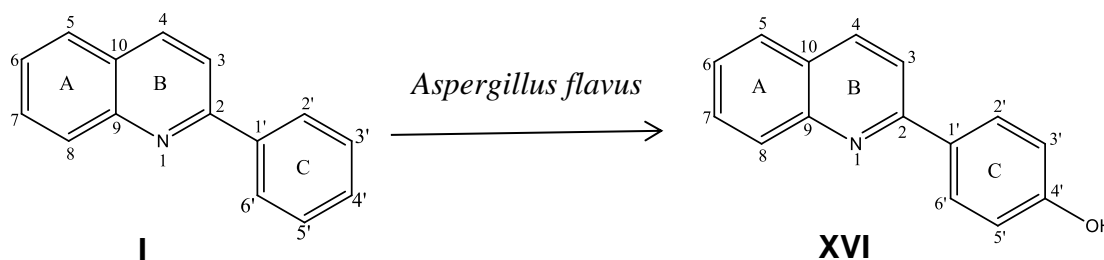


FIGURA 33- EXPANSÃO DO MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC DE DFQ2 ENTRE 7,00 - 8,5 ppm.

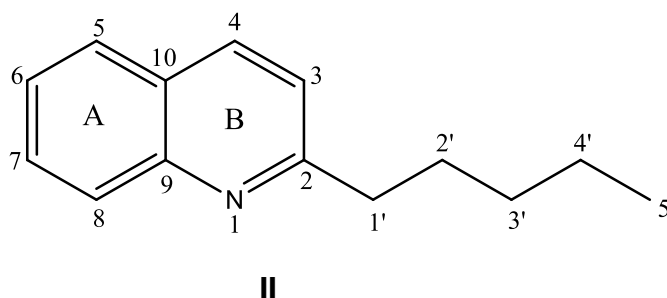
Assim, a estrutura proposta de DFQ2 nomeado como 4'-hidroxi-2-fenilquinolina foi confirmada, indicando que ocorreu uma reação de hidroxilação na posição C-4' do anel (C) da estrutura original da 2-fenilquinolina pelo fungo *A. flavus*. Na literatura foi encontrado relatos de hidroxilação nessa posição por síntese química (TAKEUCHI *et al.*, 1979), porém dados espectrais não foram disponibilizados no artigo.



ESQUEMA 5- MODIFICAÇÕES NA 2-FENILQUINOLINA POR REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO COM O FUNGO *Aspergillus flavus*.

### 4.3 Caracterização da 2-*n*-pentilquinolina

A PQ (II) obtida por síntese química conforme reação já descrita por (LI, 2007), apresentou-se como pó fino com coloração branca.



O espectro de massas apresentou íon molecular  $m/z$  200,19  $[M-H]^+$ , correspondente a massa de 199,19 Da para uma substância com fórmula molecular  $C_{14}H_{17}N$ . A estrutura da PQ foi confirmada por meio de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C comparando-se os valores de deslocamento com os dados relatados na literatura (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 34) demonstrou a presença de seis hidrogênios ligados a carbonos aromáticos: quatro dupletos em 7,44, 7,59, 7,83 e 7,94 ppm; dois tripletos em 7,48 e 7,63 ppm. O sinal relativo ao grupamento metila apareceu como um triplete em 0,99 ppm em região mais blindada do

espectro; sinais relativos aos grupamentos metileno da substância foram evidenciados como multipletos em 1,47- 2,81. Estes dados (Tabela 8) estão de acordo com os encontrados na literatura (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007).

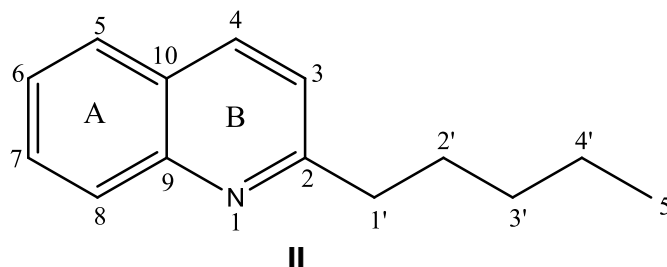


TABELA 8- DADOS DE DE RMN<sup>1</sup>H DA 2-*n*-PENTILQUINOLINA

H	$\delta$ (ppm) <sup>1</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>2</sup>	$\delta$ (ppm) <sup>3</sup>
H3	7,44 (1H, d, J= 8,0 Hz)	7,20 (1H, d, J= 8,4 Hz)	
H4	7.94 (1H, d, J= 8.5 Hz)	7.95 (1H, d, J= 8.4 Hz, C4)	
H5	7,84 (1H, d, J= 8,03 Hz)	7,63 (1H, d, J= 8,0Hz)	8,05 (2H, d, J= 8,4 Hz)
H6	7,48 (1H, t, J= 1,22 Hz)	7,35 (1H, dd, J= 8,0 e 6,7 Hz)	7,77 (1H, J= 1,3 e 8,1 Hz)
H7	7,63 (1H, t, J= 1,40 Hz)	7,56 (1H, dd, J= 7,1 e 6,7 Hz)	7,67(1H, dt, J= 1,5 e 6,5 Hz)
H8	7,59(1H, d, J= 6,97)	7,79 (1H, d, J= 7,1 Hz)	7,47 (1H, dt, J= 1,5 e 6,5 Hz)
H1'	2,81 (2H, t, J= 8.0 Hz)	2,90 (2H, dd, J=7,8 e 8,0 Hz)	7,28(1H, t, J= 8,1 Hz)
H2'	1,68 (2H, m)	1,75 (2H, m)	2,97 (2H, t, J= 8,0 Hz)
H3'	1,47 (2H, m)	1,32 (4H, m)	1,78-1,86 (2H, m)
H4'	1,47 (2H, m)	1,32 (4H, m)	1,35-1,42 (4H, m)
H5'	0,99 (3H, t, J= 7,31 Hz)	0,85 (3H, t)	0,90 (3H, t, J= 7,0 Hz)

<sup>1</sup>Dados experimentais; (CDCl<sub>3</sub>), 200 MHz

<sup>2</sup>GIMENEZ *et al.*, 2005; (CDCl<sub>3</sub>), 400 MHz

<sup>3</sup>LI *et al.*, 2007; (CDCl<sub>3</sub>), 400 MHz

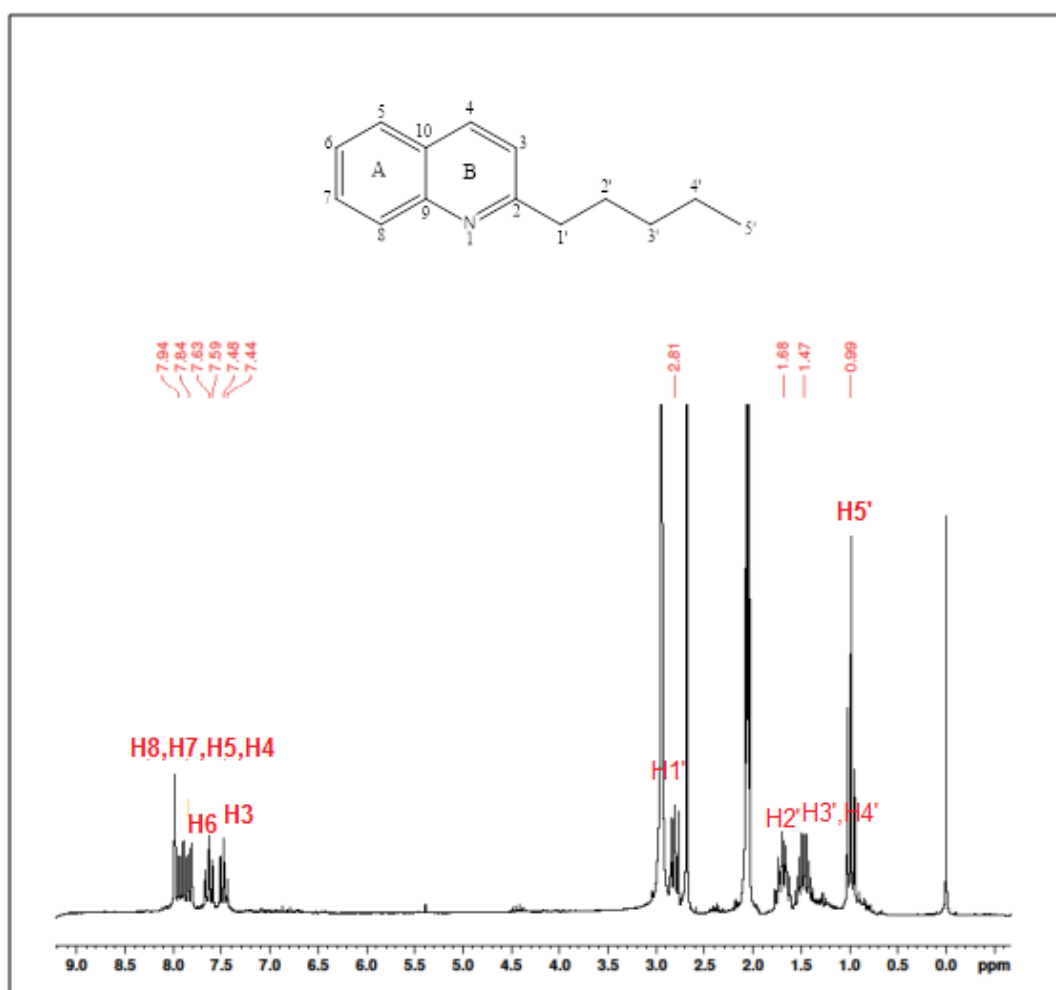
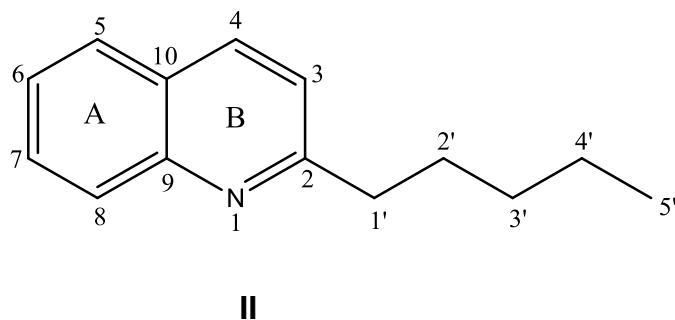


FIGURA 34- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H [200 MHz,(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO] DA 2-*n*-PENTILQUINOLINA.

O espectro de RMN<sup>13</sup>C (Figura 35), revelou sinais correspondentes aos nove carbonos aromáticos da PQ, que apareceram em região mais desblindada do espectro (100 a 165 ppm); o carbono do grupamento metila foi evidenciado em 14,0 ppm e os sinais dos carbonos dos grupamentos metileno na região de 22,0-40,0 ppm. Tendo em vista as características gerais da estrutura da PQ obtida por síntese química e que será utilizada nos experimentos de biotransformação como substrato da reação, os sinais observados se mostraram em conformidade com os dados descritos na (GIMENEZ *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007) para a mesma substância (Tabela 9).

TABELA 9- DADOS DE RMN<sup>13</sup>C DA 2-*n*-PENTILQUINOLINA

C	$\delta^1$ (ppm)	$\delta^2$ (ppm)	$\delta^3$ (ppm)
C2	159,8	162,7	163,2
C3	126,29	121,3	147,9
C4	135,18	136,1	136,2
C5	128,89	127,4	128,9
C6	127,82	125,2	127,5
C7	129,23	128,7	126,7
C8	134,64	129,2	125,6
C9	148,48	147,8	121,3
C10	128,24	126,6	129,3
C1'	32,95	39,3	39,4
C2'	23,36	29,7	31,8
C3'	32,47	31,7	29,8
C4'	23,22	22,5	22,6
C5'	14,23	14,0	14,0

NOTA: <sup>1</sup>Dados experimentais (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 50 MHz<sup>2</sup>GIMENEZ *et al*, 2005; (CDCl<sub>3</sub>), 100 MHz<sup>3</sup>LI *et al*, 2007; (CDCl<sub>3</sub>), 100 MHz

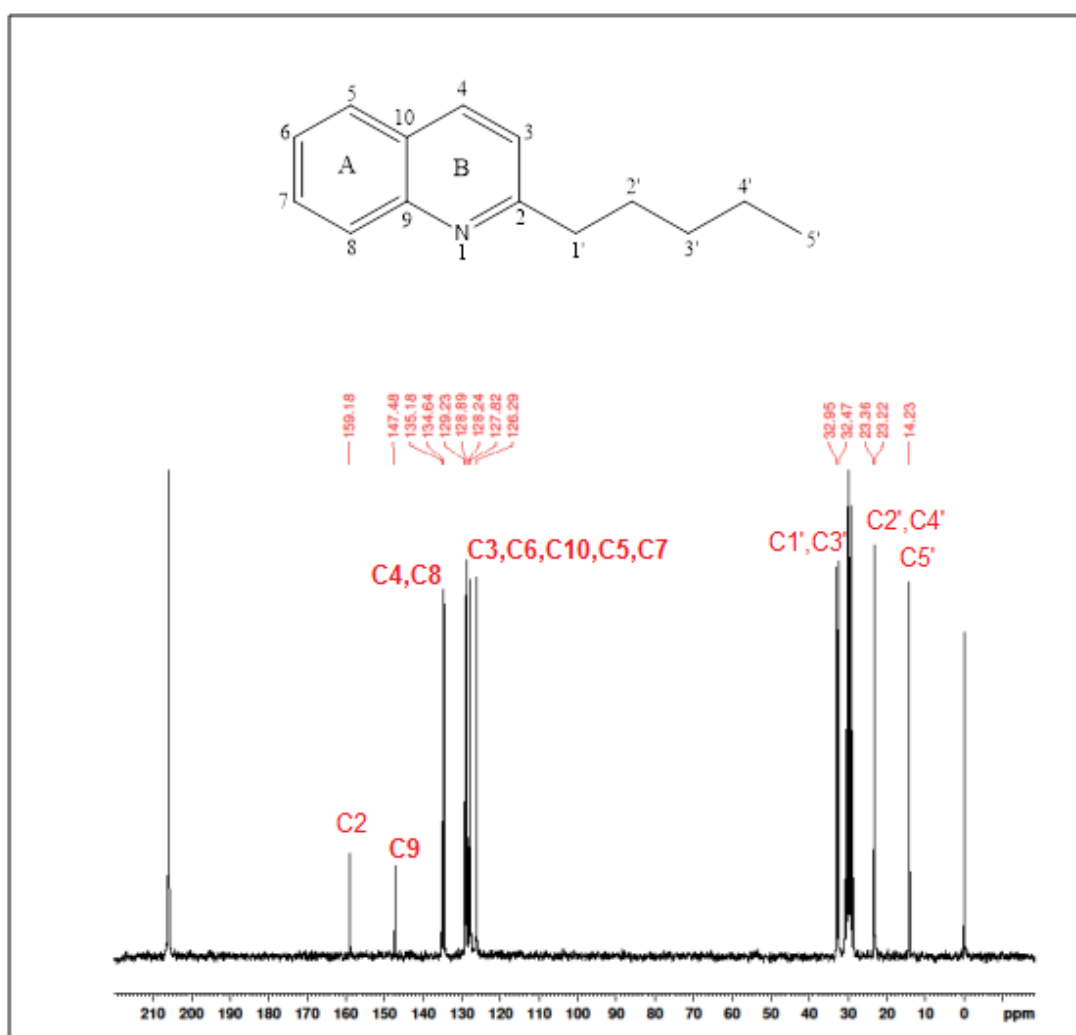


FIGURA 35- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  [50 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ] DA 2-*n*- PENTILQUINOLINA.

Reações de biotransformação foram realizadas com a substância 2-*n*-pentilquinolina (PQ), porém nenhum derivado foi obtido.

## 4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

### 4.4.1 Atividade leishmanicida

#### 4.4.1.1 Ação *in vitro* da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 sobre formas promastigotas de leishmanias

Com o objetivo de determinar a eficácia dos derivados obtidos DFQ1 e DFQ2 na forma promastigota do parasito, foram usadas três espécies diferentes de Leishmania: *L. braziliensis* (Lb) e *L. amazonensis* (La) e *L. infantum* (Li). A viabilidade celular foi avaliada em tempos diferenciados de tratamento (24, 48 e 72 h) usando concentrações que variaram entre 4-2048  $\mu\text{M}$ . Embora o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®) não se apresente como uma substância eficaz contra formas promastigotas, ele foi, juntamente com a Anfotericina B utilizado como controle positivo de morte celular.

A Figura 36 ilustra a citotoxicidade de um desses tratamentos após 72 h, de onde as  $\text{CI}_{50}$  foram obtidas e estão agrupadas na Tabela 10.

TABELA 10- VALORES DE  $\text{CI}_{50} \pm \text{DP}$  DA 2-FENILQUINOLINA (FQ) E SEUS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2, *N*-METILGLUCAMINA (GLUCANTIME®) E ANFOTERICINA B, AVALIADOS CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* E *L. infantum*, PELO MÉTODO DO MTT

Substância	tempo de tratamento (em horas)	<i>L. amazonensis</i> $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>L. braziliensis</i> $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	<i>L. infantum</i> $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
FQ	24	>500	>500	>500
	48	>500	>500	>500
	72	>500	>500	>500
DFQ1	24	5,41 $\pm$ 0,20	98,25 $\pm$ 0,22	69,54 $\pm$ 0,19
	48	0,44 $\pm$ 0,18	63,01 $\pm$ 0,28	7,37 $\pm$ 0,23
	72	0,24 $\pm$ 0,14	10,32 $\pm$ 0,26	4,27 $\pm$ 0,32
DFQ2	24	298,64 $\pm$ 0,35	385,65 $\pm$ 0,71	290,67 $\pm$ 0,34
	48	203,65 $\pm$ 0,70	289,32 $\pm$ 0,57	230,45 $\pm$ 0,45
	72	165,45 $\pm$ 0,35	202,65 $\pm$ 0,35	178,42 $\pm$ 0,71
Glucantime	24	285,60 $\pm$ 0,35	345,65 $\pm$ 0,28	315,64 $\pm$ 0,85
	48	125,50 $\pm$ 0,45	142,70 $\pm$ 0,47	67,46 $\pm$ 0,38
	72	79,40 $\pm$ 0,48	122,80 $\pm$ 0,60	41,48 $\pm$ 0,37
Anfotericina B	24	12,50 $\pm$ 0,41	20,06 $\pm$ 0,50	19,88 $\pm$ 0,48
	48	9,60 $\pm$ 0,43	16,78 $\pm$ 0,51	8,72 $\pm$ 0,54
	72	7,84 $\pm$ 0,42	15,39 $\pm$ 0,53	6,95 $\pm$ 0,57

NOTA: OS RESULTADOS CORRESPONDEM À MÉDIA DE QUATRO EXPERIMENTOS INDEPENDENTES COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%.



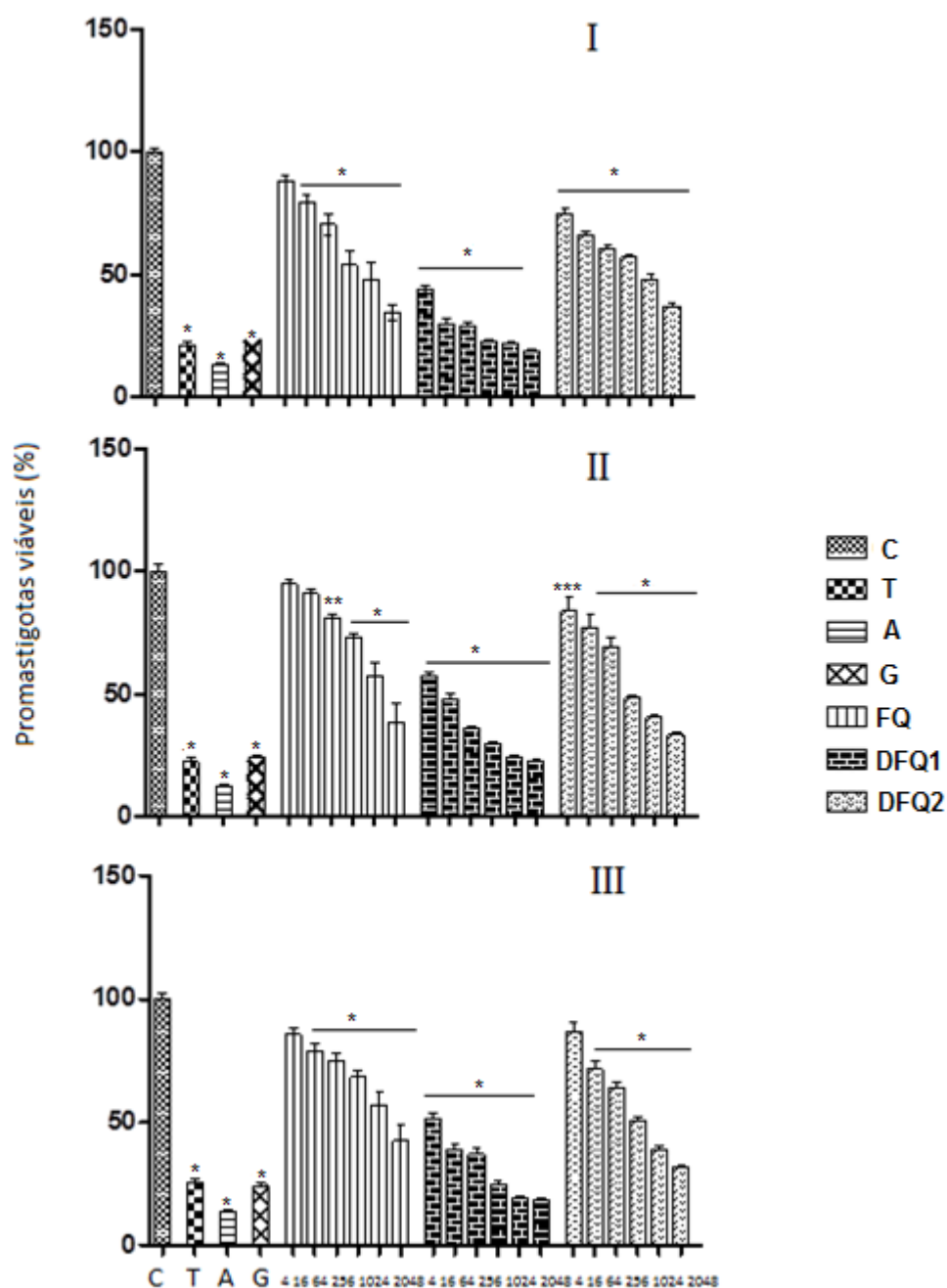


FIGURA 36 - GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* (I), *L. braziliensis* (II) e *L. infantum* (III).

NOTA: Resultados determinados pelo ensaio de redução do MTT (%promastigotas viáveis) após incubação por 72 h com diferentes concentrações (4-2048 μM) de 2-Fenilquinolina (FQ), DFQ1 e DFQ2, Triton X-100 a 20% (T), Anfotericina B a 40 μM (A) e Glucantime® a 800 μM (G), foram utilizados como controle positivo de morte celular. As barras representam a porcentagem média ± DP e correspondem às células metabolicamente ativas em relação ao controle (100%). [\*]  $p < 0,05$ ; [\*\*]  $p < 0,001$  e [\*\*\*]  $p < 0,0001$  (n=4).

Neste estudo, o valor de  $CI_{50}$  para FQ foi superior a 500  $\mu M$  independente da espécie ou do tempo de tratamento, não sendo observado, portanto atividade leishmanicida potente, o que é compatível com dados da literatura (FOURNET *et al.*, 1994b).

Com relação ao DFQ1, entretanto, observou-se atividade citotóxica extremamente acentuada e influenciada diretamente pelo tempo de exposição em relação à FQ, inclusive superior à potência demonstrada pela Anfotericina B, um dos medicamentos não só mais utilizados atualmente no tratamento da doença, como também como referência em estudos *in vitro* semelhantes a este trabalho. Neste contexto, após 24 h, por exemplo, esta substância mostrou-se com potência pelo menos noventa vezes superior a FQ em relação a *L. amazonensis*, pelo menos sete vezes para a *L. infantum* e pelo menos cinco vezes para a *L. braziliensis*. Após 48 h, observou-se potência mil vezes superior para a *L. amazonensis*, quase setenta vezes para a *L. infantum* e pelo menos oito vezes para a *L. braziliensis*. O ápice deste efeito foi atingido após 72 h de tratamento, quando se registrou uma potência pelo menos duas mil vezes mais intensa para a *L. amazonensis*, pelo menos 110 vezes para a *L. infantum* e pelo menos 48 vezes para a *L. braziliensis* quando comparadas à potência da FQ.

Em relação ao DFQ2 também se observou maior potencial de ação quando comparada a FQ, mas inferior aos resultados obtidos com a substância Anfotericina B.

O fato de que compostos quinolínicos são substâncias com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antileishmania, apresentando citotoxicidade contra um amplo espectro de espécies de leishmanias não é desconhecido (FOURNET *et al.*, 1994b, FOURNET *et al.*, 1993, FRANCK *et al.*, 2004, DESRIVOT *et al.*, 2007, VIEIRA *et al.*, 2008, MISHRA *et al.*, 2009b, TIUMAN *et al.*, 2011, BOMPART *et al.*, 2013, GOPINATH *et al.*, 2013, UPADHAYAYA *et al.*, 2013) e confirmou-se, neste trabalho, com a inserção de hidroxilas nas posições 5 e 6 no anel A e na posição 4' no anel C da FQ, levando a formação do DFQ1 e DFQ2, respectivamente, tornando-as mais polares e, conseqüentemente, aumentando sua solubilidade em meio aquoso. Este fato talvez seja um dos fatores que

favoreceram, de forma relevante, a atividade antileishmania *in vitro* demonstrada por ambos. Entretanto, nossos resultados mostraram que as inserções no anel A favoreceram de forma muito mais intensa esta atividade. Sendo o DFQ1 uma substância ainda não descrita na literatura e dotada de relevante atividade em estudos preliminares, ensaios utilizando sistemas biológicos mais complexos tornam-se necessários a fim de ratificar o potencial aqui observado.

Estudos realizados pelos grupos de Bompert (2013) e Gopinath (2013) com substâncias estruturalmente parecidas com as obtidas em nosso trabalho também indicaram atividade antileishmania pronunciada contra formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. donovani*, respectivamente.

#### 4.4.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível comprovar as alterações que os tratamentos após 72 h com a  $CI_{50}$  das substâncias DFQ1 e DFQ2 causaram nas estruturas intracelulares de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

##### 4.4.1.2.1 Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania amazonensis* devido ao tratamento com a substância DFQ1

Formas promastigotas não tratadas (Figura 37 I e II) e tratadas com a  $CI_{50}$  (Figura 37 III e IV) foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Nos parasitos tratados com a  $CI_{50}$  após 72 h foram observadas grandes alterações ultraestruturais nas formas promastigotas como: inchaço mitocondrial, alterações nuclear com condensação da cromatina e alteração no formato, além de notável aumento de inclusões lipídicas, alterações na membrana plasmática da célula e numerosos vacúolos já ocupam grande parte do citoplasma das células, além de alterações na morfologia da membrana plasmática. A pouca presença de material citoplasmático, perda de morfologia e alterações nucleares e mitocondriais foram irreversíveis.

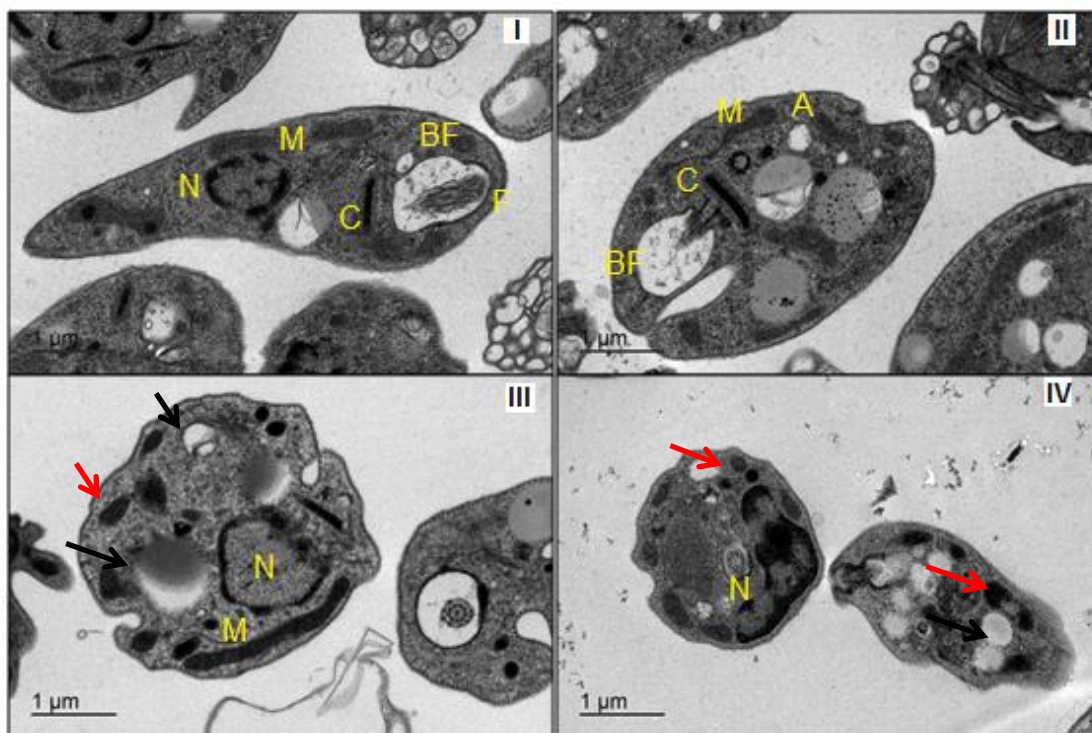


FIGURA 37 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* TRATADAS COM O DFQ1.

NOTA: I e II- Células controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (C) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar (BF), núcleo central (N) com nucléolo e nucleoplasma homogêneo e eletrodense, mitocôndria sem alterações ultraestruturais, presença de acidocalcissomos (A). III e IV Cortes ultrafinos de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas por 72 h com a  $CI_{50}$  do DFQ1, observando alterações ultraestruturais tais como: alterações nucleares e desorganização citoplasmática, aumento do número de vacúolos intracelulares (setas pretas), inchaço mitocondrial evidente e alteração na membrana plasmática, notável aumento de inclusões lipídicas (setas vermelhas) e desorganização nuclear, cinetoplasto não identificado, perda completa da morfologia normal da célula. Barras (I, II, III e IV) 1 µm. (N) NÚCLEO, (M) MITOCÔNDRIA, (BF) BOLSA FLAGELAR, (F) FLAGELO, (C) CINETOPLASTO, ACIDOCALCISSOMA (A).

#### 4.4.1.2.2 Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania braziliensis* devido ao tratamento com a substância DFQ1

Na Figura 38 I e II, se visualiza a fotomicrografia das formas promastigotas controle (72 h) de *L. braziliensis*, apresentando morfologia normal, núcleo íntegro, cinetoplasto em forma de bastão, bem desenvolvido e próximo à bolsa flagelar contendo o flagelo em seu interior, além da mitocôndria com tamanho e aspecto normal. O tratamento após 72h com a  $CI_{50}$  da substância DFQ1 (Figura 38 III e IV), levou a uma acentuada redução no número de parasitos e surgimento de formas promastigotas com alterações

ultraestruturais. É possível observar alterações nucleares, como condensação da cromatina e alteração no formato do núcleo, presença de vacúolos citoplasmáticos e aumento de inserções lipídicas, alterações na membrana plasmática são evidentes, assim como perdas das principais organelas citoplasmáticas.

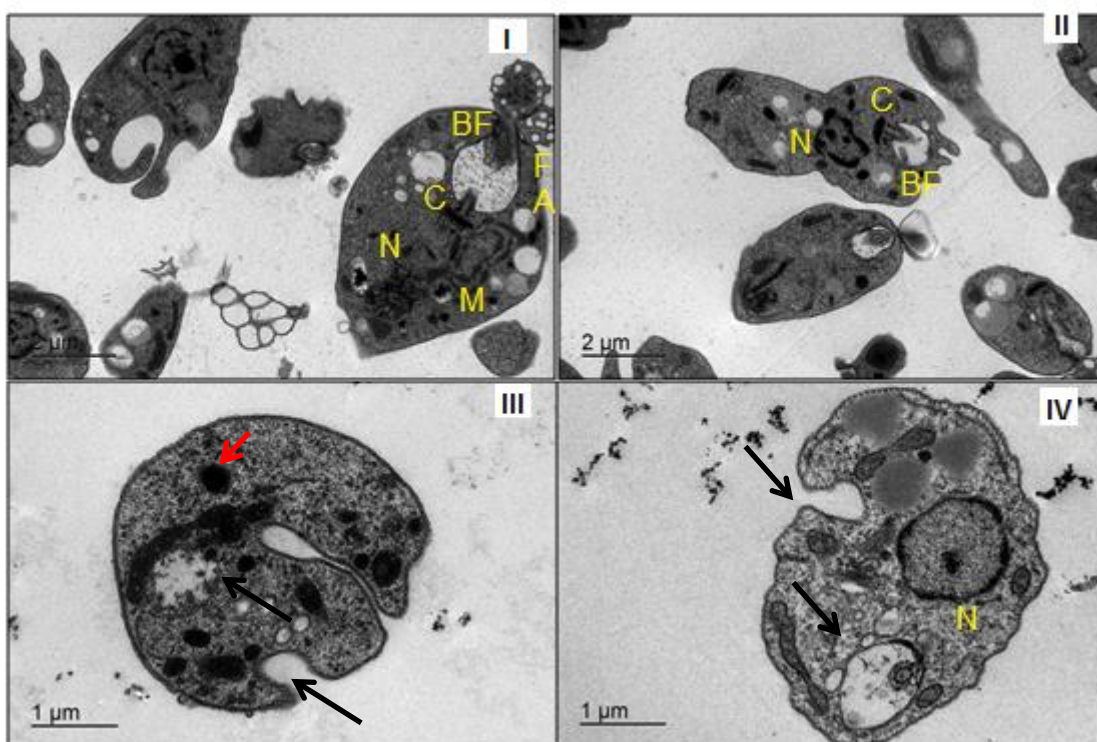


FIGURA 38 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* TRATADAS COM DFQ1.

NOTA: I e II- Células controle sem alterações aparentes em sua morfologia, apresentando: cinetoplasto (C) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo a bolsa flagelar (BF), núcleo central (N) com nucléolo e nucleoplasma homogêneo e eletrodenso, mitocôndria (M) sem alterações ultraestruturais, presença de acidocalcissomo (A). III e IV- Cortes ultrafinos de promastigotas de *L. braziliensis* tratadas por 72 h com a  $CI_{50}$  do DFQ1, com alterações ultraestruturais importantes tais como desorganização nuclear, surgimento de vacúolos por todo o citoplasma (setas pretas), desintegração da membrana plasmática e presença de numerosas inclusões lipídicas (setas vermelhas), perda completa da morfologia normal da célula. Barras (I, III e IV): 1 µm, (II): 2 µm. (N) NÚCLEO, (M) MITOCÔNDRIA, (BF) BOLSA FLAGELAR, (F) FLAGELO, (C) CINETOPLASTO, ACIDOCALCISSOMO (A).



#### 4.4.1.2.3 Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania amazonensis* devido ao tratamento com a substância DFQ2

As possíveis alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. amazonensis* também foram avaliadas após o tratamento com a  $CI_{50}$  (Figura 39, III e IV) da substância DFQ2 utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão. Após 72 h de tratamento, foi possível observar pequenas alterações nas células tais como: leve inchaço mitocondrial, alteração nuclear, com condensação da cromatina e alteração do formato do núcleo, pequena quantidade de inclusões lipídicas e alterações iniciais na membrana plasmática da célula.

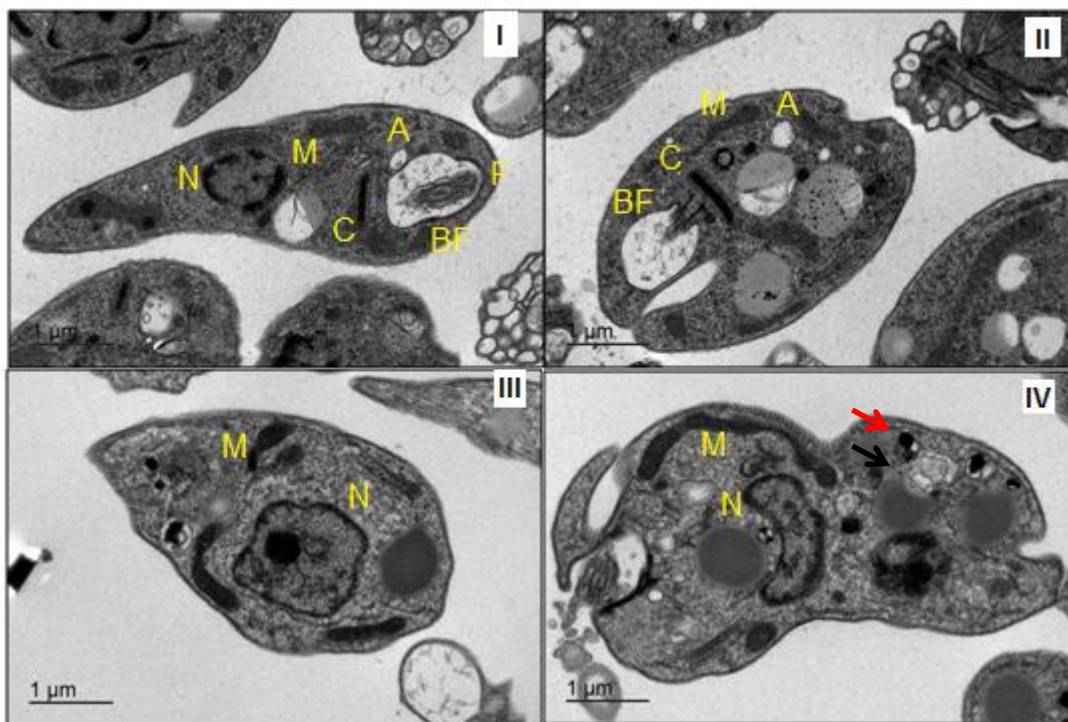


FIGURA 39 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* TRATADAS COM O DFQ2.

NOTA: I e II- Células controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (C) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo à bolsa flagelar (BF), núcleo central (N) com nucléolo e nucleoplasma homogêneo e eletrodense, mitocôndria sem alterações ultraestruturais, presença de acidocalcisomos (A). III e IV- Cortes ultrafinos de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas por 72 h com a  $CI_{50}$  do DFQ2, com poucas alterações ultraestruturais: mitocôndria com um leve inchaço, alteração nuclear, pequena quantidade de inclusões lipídicas (setas vermelhas), alterações iniciais na membrana plasmática da célula. Barras (I, II, III e IV): 1  $\mu$ m. (N) NÚCLEO, (M) MITOCÔNDRIA, (BF) BOLSA FLAGELAR, (F) FLAGELO, (C) CINETOPLASTO, (A) ACIDOCALCISSOMA.

#### 4.4.1.2.3 Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania braziliensis* devido ao tratamento com a substância DFQ2

As formas promastigotas não tratadas apresentaram aspecto normal (Figura 40 I e II), tendo seu formato alongado mantido. As organelas celulares com aparência normal, o núcleo apresentando cromatina descondensada, bem como cinetoplasto único nas células e com aspecto normal, localizado na região posterior da célula, também é possível visualizar a presença de acidocalcissomo.

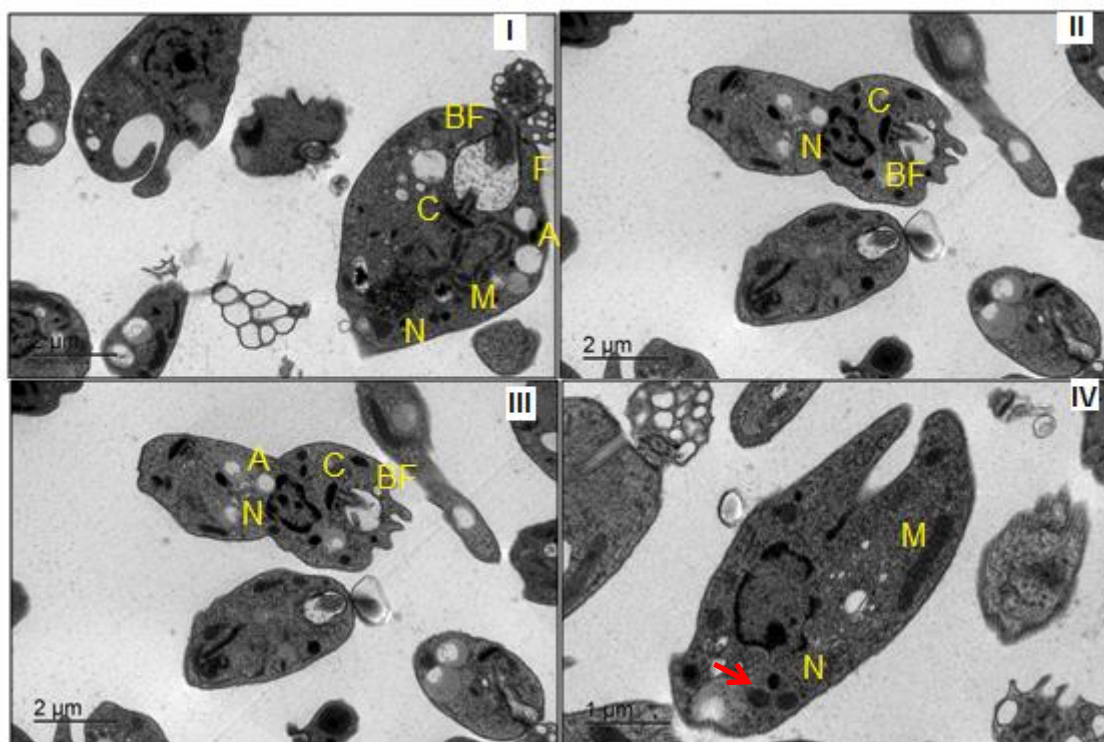


FIGURA 40 - ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* TRATADAS COM DFQ2.

NOTA: I e II- Células controle sem alterações aparentes em sua morfologia, apresentando: cinetoplasto (C) em forma de bastão bem desenvolvido e próximo à bolsa flagelar (BF), núcleo central (N) com nucléolo e nucleoplasma homogêneo e eletrodenso, mitocôndria (M) sem alterações ultraestruturais e acidocalcissomo (A). III e IV cortes ultrafinos de promastigotas de *L. braziliensis* tratadas por 72 h com a  $CI_{50}$  do DFQ2, com pequenas alterações ultraestruturais tais como, alteração nuclear, com condensação da cromatina e alteração do formato do núcleo, pequena quantidade de inclusões lipídicas (setas vermelhas) e alterações iniciais na membrana plasmática da célula, porém muitas das organelas celulares se mostram preservadas. Barras (IV): 1 µm, (I, II e III): 2 µm. (N) NÚCLEO, (M) MITOCÔNDRIA, (BF) BOLSA FLAGELAR, (F) FLAGELO, (C) CINETOPLASTO, (A) ACIDOCALCISSOMO.

Após 72 h de tratamento com a  $CI_{50}$  (Figura 40 III e IV) da substância DFQ2, foi possível observar pequenas alterações nas células, alteração nuclear, com condensação da cromatina e alteração do formato do núcleo, pequenas quantidades de inclusões lipídicas e alterações iniciais na membrana plasmática da célula, porém muitas das organelas celulares se mostraram preservadas.

#### 4.4.1.3 Citotoxicidade em macrófagos Raw e fibroblastos McCoy

Como visto na introdução deste trabalho, quando o organismo é atacado pelas formas promastigotas do protozoário, os macrófagos teciduais as fagocitam e sinalizam para o sistema imune, informando-o da infecção. Um medicamento leishmanicida deve, portanto, preservar a integridade dos macrófagos, uma das principais células de defesa envolvidas na leishmaniose, e dos tecidos periféricos que os abrigam.

Com o objetivo de, indiretamente, verificar os efeitos do DFQ1 e DFQ2 sobre os macrófagos e fibroblastos, representantes dos tecidos, usou-se a linhagens de macrófagos RAW e de fibroblastos McCoy.

Os resultados dos ensaios sobre células RAW estão demonstrados na Figura 41 (24, 48 e 72 h), sendo semelhantes entre si e influenciados pelo tempo de exposição. Ou seja, ambos DFQ1 e DFQ2 demonstraram toxicidade significativa somente em concentrações iguais ou superiores a 256  $\mu$ M em todos os tempos testados e sendo mais tóxicos que a FQ.



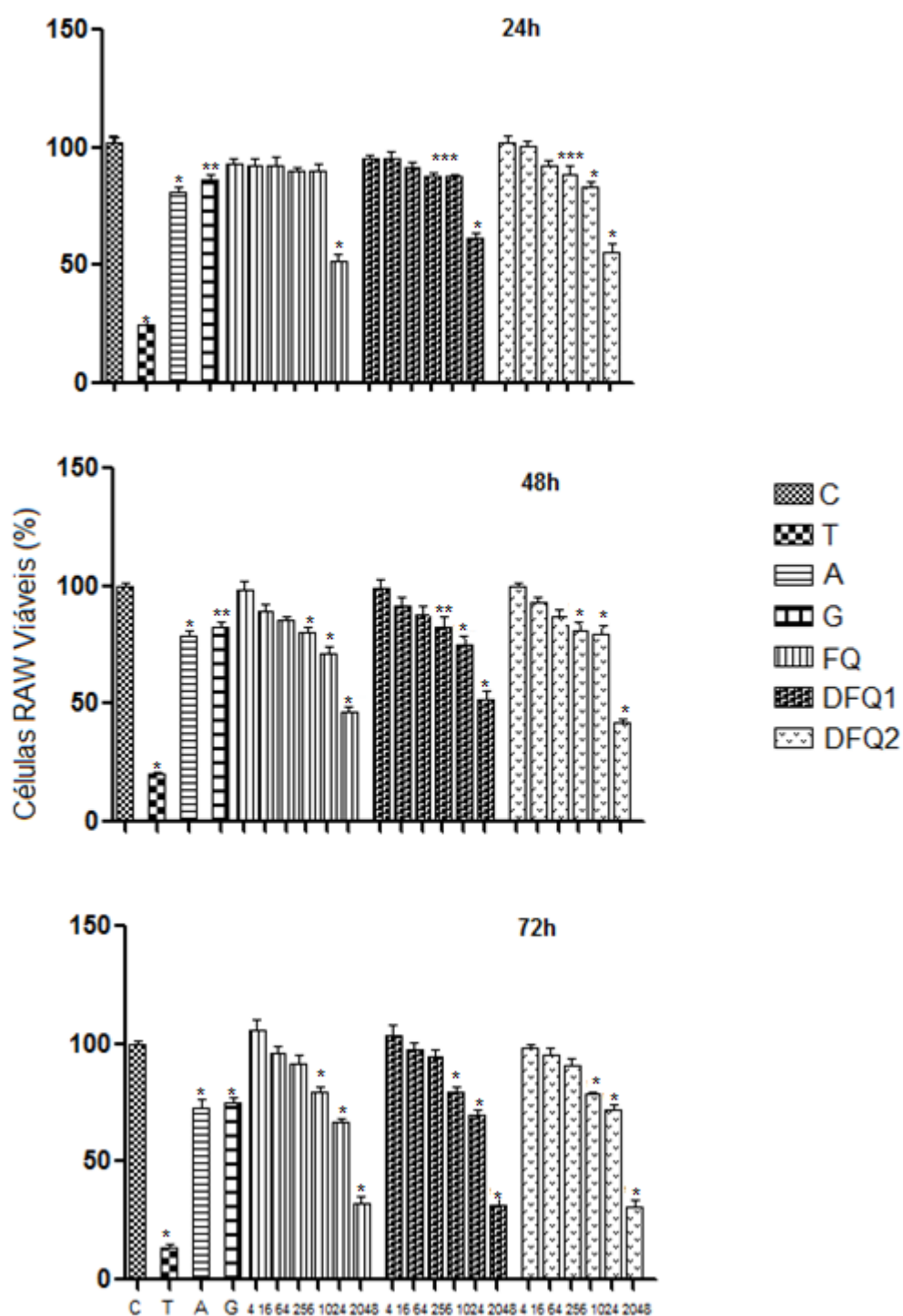


FIGURA 41 – GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE MACRÓFAGOS RAW.

NOTA: Resultados determinados pelo ensaio de redução do MTT (%células Raw viáveis) após incubação por 24, 48 e 72 h, com diferentes concentrações (4-2048  $\mu\text{M}$ ) de Fenilquinolina (FQ) e seus derivados (DFQ1) e (DFQ2), Triton X-100 (T) a 20%, Anfotericina B (A) a 40  $\mu\text{M}$  e Glucantime® (G) a 800  $\mu\text{M}$ , também foram avaliados. As barras representam a porcentagem média  $\pm$  DP e correspondem às células metabolicamente ativas em relação ao controle (100%). [\*\*\*]  $p < 0.0001$ ; [\*\*]  $p < 0.001$  e [\*]  $p < 0.05$  (n=3).

#### 4.4.1.4 Citotoxicidade em células McCoy

Os resultados dos ensaios com células McCoy estão demonstrados na Figura 42 (24, 48 e 72 h).

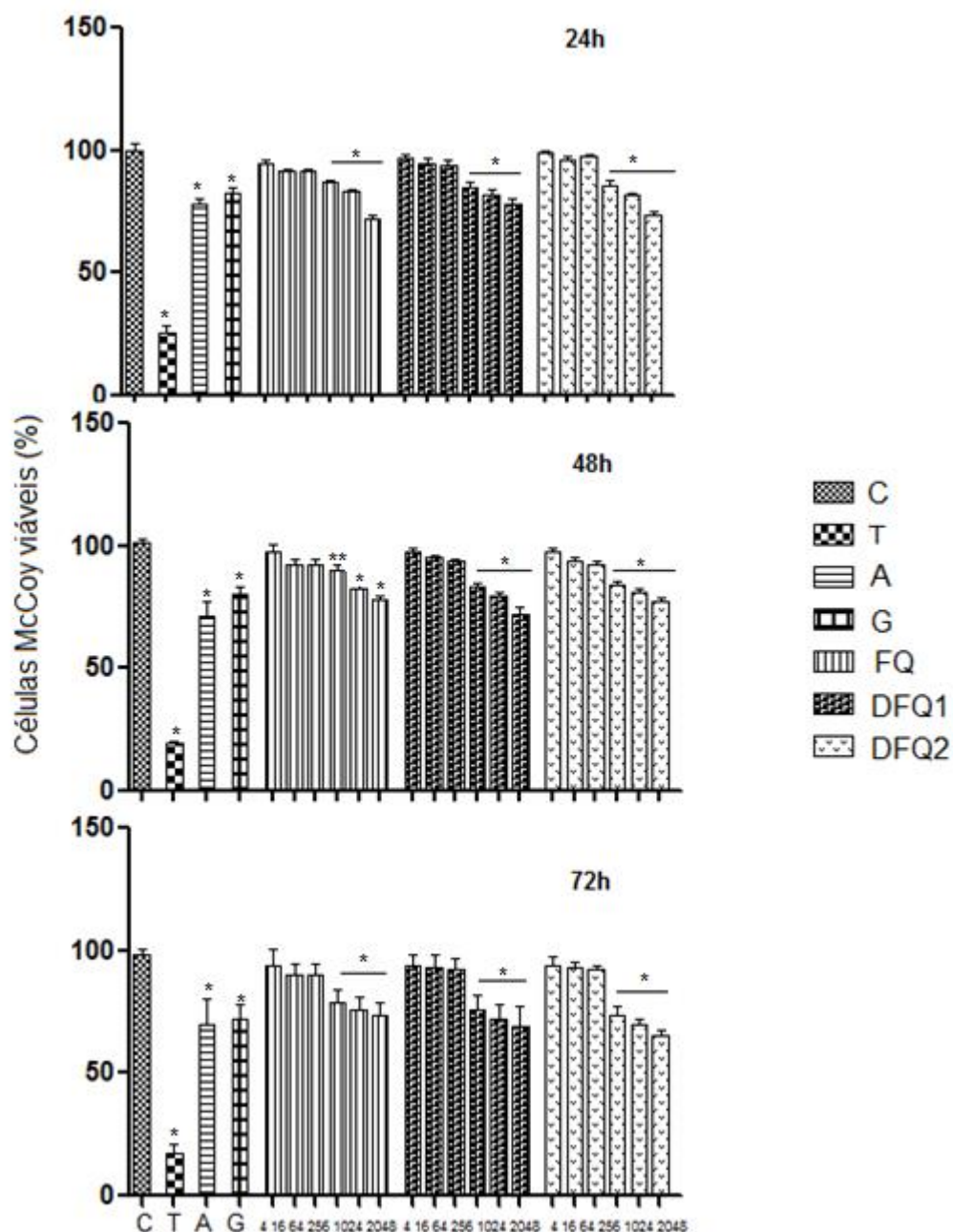


FIGURA 42 – GRÁFICO DE CITOTOXICIDADE DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE CÉLULAS McCoy.

NOTA: Resultados determinados pelo ensaio de redução do MTT (% células McCoy viáveis) após incubação por 24, 48 e 72 h, com diferentes concentrações (4-2048 µM) de Fenilquinolina (FQ) e seus derivados DFQ1 e 2 DFQ2, Triton X-100 (T) a 20%, Anfotericina B (A) a 40 µM e Glucantime® (G) a 800 µM, também foram avaliados. As barras representam a porcentagem média ± DP e correspondem às células metabolicamente ativas em relação ao controle (100%). [\*] p<0,05 e [\*\*] p<0,001 (n=3).

Os resultados dos tratamentos apresentaram perfil de ação muito semelhante aos obtidos com macrófagos Raw, sendo influenciados diretamente pelo tempo de exposição. Ambos, DFQ1 e DFQ2, demonstraram toxicidade significativa somente em concentrações iguais ou superiores a 256  $\mu$ M em todos os tempos testados e sendo mais tóxicos que a FQ.

A adesão da *Leishmania* à membrana do macrófago é pré-requisito para sua fagocitose. A pequena fração infectante que consegue internalizar-se em macrófagos desencadeia várias reações bioquímicas que podem levar à ativação ou à inibição da célula hospedeira. Sob essa perspectiva, os resultados obtidos para o DFQ1 tornam-se relevantes quando o processo de infecção é visualizado: se por uma lado mostrou-se eficaz em doses menores que 10  $\mu$ M contra formas promastigotas, estas, ainda estando no ambiente extracelular, seriam rapidamente destruídas, enquanto por outro lado as células residentes (macrófagos e fibroblastos) seriam preservadas, ajudando na deflagração do processo de defesa.

#### 4.4.3 Atividade anti-inflamatória

##### 4.4.3.1 Efeito de FQ, DFQ1 e DFQ2 sobre mononucleares e granulócitos humanos

A realização de ensaios biológicos com células humanas exige testes preliminares para avaliação da toxicidade das substâncias a serem avaliadas. Neste contexto, o ensaio que utiliza o corante Azul de Trypan é muito útil, pois permite observar este efeito sobre as células em estudo, as quais possuindo membrana citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (MERCHANT, 1964). Desta forma, células viáveis, após alguns minutos em contato com o corante, apresentam-se incolores, esféricas e refringentes, enquanto as células mortas ou inviáveis coram-se em azul. Neste trabalho, o corante Azul de Trypan foi utilizado para avaliar o efeito da FQ e seus derivados sobre leucócitos humanos.

Em um primeiro momento, os leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram divididos em duas populações, granulócitos (GNC) e

mononucleares (MNC), ambas obtidas após centrifugação com gradiente de densidade. Como esperado, citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa dessas populações demonstraram que linfócitos e monócitos predominaram entre os MNC ( $> 95\%$ ), enquanto neutrófilos e raros eosinófilos constituíram mais de 99% da fração dos GNC ( $n = 3$ ). Além disso, somente amostras contendo  $\geq 90\%$  de células viáveis após o processo de isolamento, independente da fração em análise, foram utilizadas nos experimentos.

Com o objetivo de avaliar sua toxicidade, leucócitos GNC e MNC foram expostos a concentrações crescentes (0,005 a 50  $\mu\text{M}$ ) de FQ, DFQ1 e DFQ2 e seus efeitos investigados com Azul de Trypan sob microscopia de luz, após 5 h de incubação a 37°C para os GNC e, para a população de MNC, após cinco dias de cultivo, a 37°C, sob atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Esses períodos de incubação antes de se acessar a viabilidade celular, diferenciados entre as populações, correspondem àquele necessário para a realização dos ensaios de quimiotaxia com GNC e àquele em que se pode observar alguma atividade imunomodulatória nas condições experimentais previamente estabelecidas em nosso laboratório (MACHADO JR *et al*, 2006). Para os MNC, avaliou-se também a possibilidade de efeitos na presença de PHA, uma vez que essas células seriam ativadas por esse mitógeno. Os resultados apresentados foram normalizados em relação aos controles, constituídos de populações não expostas a nenhuma das substâncias em estudo, adotando-os como 100% de viabilidade celular e estão ilustrados na Figura 43.

Para GNC, somente a maior concentração (50  $\mu\text{M}$ ) utilizada apresentou toxicidade significativa, quando a viabilidade observada em relação às células não tratadas foi de somente  $92,0 \pm 2,08\%$  ( $p < 0,05$ ) para FQ, de  $95,39 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,001$ ), para DFQ1 e de  $92,23 \pm 1,53\%$  ( $p < 0,05$ ) para DFQ2, após 5 h de incubação ( $n=3$ ). Em contraste, a 5  $\mu\text{M}$ , a viabilidade das células para essas mesmas substâncias foi de  $96,0 \pm 1,73$ ,  $96,33 \pm 0,58\%$  e  $97,00 \pm 1,09\%$ , respectivamente ( $n=3$ ).

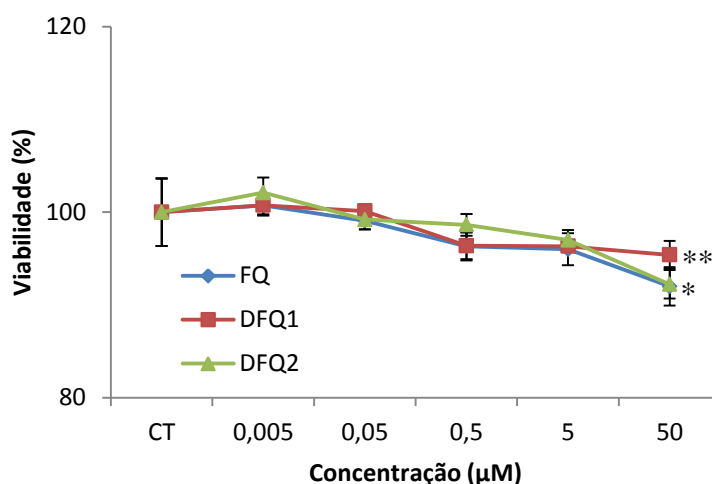


FIGURA 43 - EFEITO DA 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A VIABILIDADE DE GRANULÓCITOS HUMANOS.

NOTA: Granulócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios, após isolamento em gradiente de densidade, foram expostos às concentrações indicadas de 2-Fenilquinolina (FQ), DFQ1 e DFQ2 e incubados por 5 h, a 37°C. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP, em porcentagem, de células viáveis verificadas pelo teste de Azul de Trypan após normalização dos dados em relação ao controle. [\*]  $p < 0,05$  e [\*\*]  $p < 0,001$  ( $n = 3$ ).

Quanto aos MNC (Figura 44), após cinco dias de incubação, evidenciou-se ausência significativa de toxicidade e, a 50  $\mu$ M, por exemplo, cuja concentração foi tóxica para GNC, a viabilidade para os MNC expostos a FQ, ao DFQ1 e ao DFQ2 manteve-se elevada, com  $96,08 \pm 2,65\%$ ,  $97,03 \pm 2,65\%$  e  $96,51 \pm 6,53\%$ , respectivamente, de células vivas recuperadas em relação ao controle.

Quando o mitógeno PHA foi adicionado ao meio, também nenhum efeito tóxico significativo dessas substâncias sobre os MNC foi observado. Interessante notar que a adição de PHA ao meio contendo FQ e DFQ2 parece ter exercido efeito protetor sobre essas células, uma vez que, a 50  $\mu$ M, uma porcentagem superior de células manteve-se viável, com  $97,46 \pm 4,02\%$  e  $97,35 \pm 6,53\%$  ( $n = 3$ ), respectivamente, de células recuperadas. Com esse estudo e os resultados dele derivados foi possível estabelecer as concentrações que seriam utilizadas para os ensaios propostos utilizando leucócitos humanos.

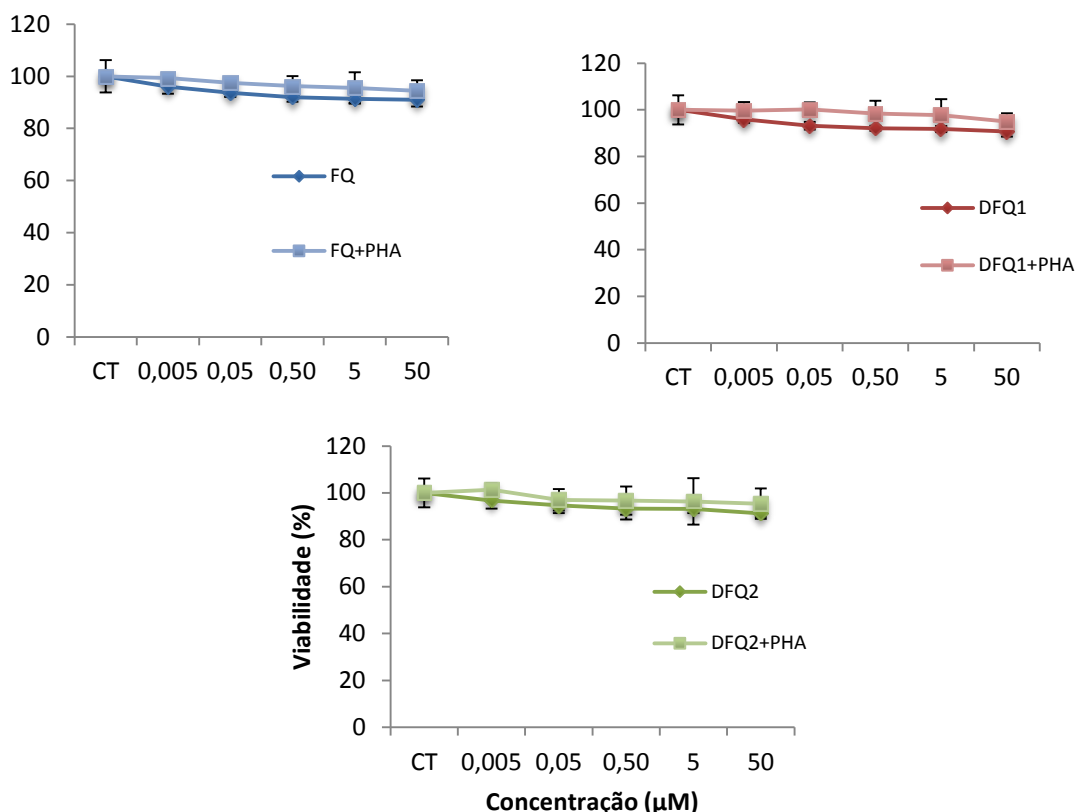


FIGURA 44 - EFEITO DAS 2-FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A VIABILIDADE DE LEUCÓCITOS MONONUCLEARES HUMANOS.

NOTA: Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com as concentrações indicadas de 2-Fenilquinolina (FQ), de DFQ1 e de DFQ2 e incubados por 5 dias em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Os pontos representam a média  $\pm$  DP, em porcentagem, de células viáveis verificada pelo teste de azul de tripiano, normalizados em relação ao controle (n = 3).

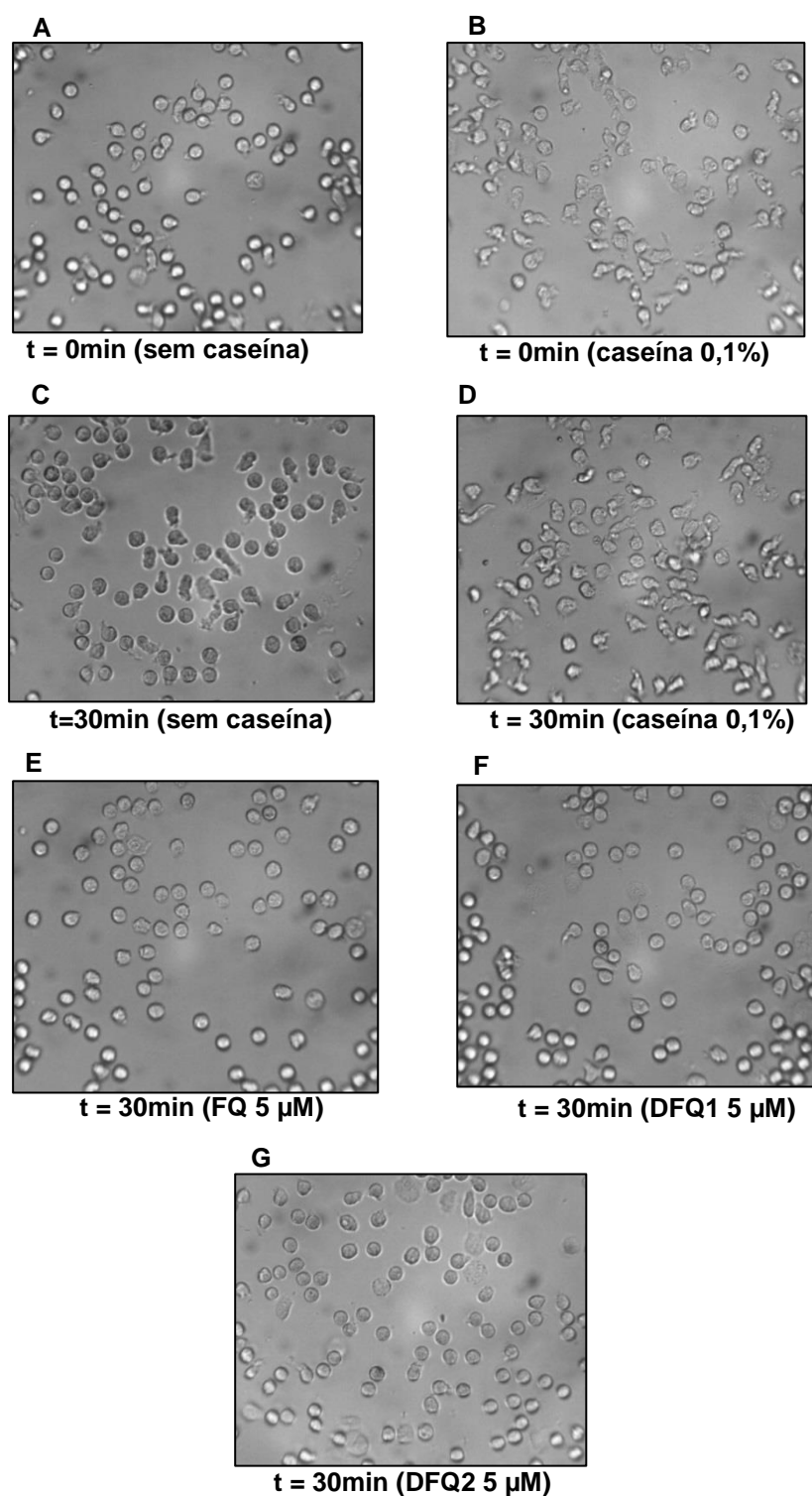
#### 4.4.3.2 Polarização leucocitária

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo as primeiras células a chegar às áreas de lesão. Aí, desempenham inúmeras funções com a finalidade de eliminar o agente agressor. A locomoção por si só envolve uma série de fases como previamente revisto na introdução desta tese, incluindo alterações das propriedades de adesividade, de forma e de orientação da célula em estudo. Quando em presença de um agente estimulante, a polaridade morfológica, ou a alteração da forma, são respostas imediatas das células que se encontram em suspensão, e independem da sua adesão a um substrato.

Dentro desse contexto, há uma série de ensaios que permitem observar essas alterações, os quais devem ser usados preliminarmente ao se questionar às habilidades locomotoras de uma substância. Estes, quando positivos, constituem o primeiro indício experimental para o reconhecimento do potencial quimiotático de uma substância (WILKINSON e HASTON, 1988).

Com a finalidade de se investigar a capacidade da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 em induzir alterações no comportamento locomotor de leucócitos humanos, realizou-se o ensaio de polarização usando metodologia semelhante à descrita por ZIGMOND (1988) e outros autores (WILKINSON, 1996; WILKINSON, 1998), onde a morfologia de leucócitos obtidos de voluntários sadios foi observada imediatamente ( $t = 0$  min) e após 30 minutos de incubação ( $t = 30$  min) em salina tamponada suplementada (PBSs), na presença ou não de caseína (item 3.4.2.6) e, também, na presença das substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2.

Como demonstrado na Figura 45, a morfologia esférica inicial das células em suspensão (Figura 45/A) foi imediatamente alterada pela presença de caseína (Figura 45/B). Essa morfologia irregular acentuou-se ainda mais ao final dos 30 minutos de incubação a 37°C (Figura 45/D), em contraste com a população não tratada (Figura 45/C), a qual permaneceu predominantemente esférica.



**FIGURA 45 - POLARIZAÇÃO LEUCOCITÁRIA INDUZIDA POR CASEÍNA.**

NOTA: Fotomicrografias de leucócitos humanos fixados em glutaraldeído após serem ressuspensos em PBSs suplementado com 10% de soro bovino fetal (**A**) e na presença de caseína 0,1% (**B**). Após 30 minutos de incubação a 37°C, polarização celular na forma de projeções citoplasmáticas foi observada na população tratada com caseína (**D**), contrastando-se a forma alongada com a original, esférica, da população incubada na sua ausência (**C**) e, também, no tratamento com FQ (**E**), DFQ1 (**F**) e DFQ2 (**G**).



O efeito polarizador da caseína foi observado com clareza com a formação de projeções citoplasmáticas agudas, lembrando pseudópodos, levando à morfologia característica, com alongamento da célula na forma cabeça-cauda (Figura 45/D). Esses resultados demonstraram que a caseína utilizada teve a habilidade de polarizar a maioria dos leucócitos humanos em suspensão, sugerindo comportamento similar ao descrito para substâncias quimiotáticas (WILKINSON e HASTON, 1988). Além disso, tornou factível seu uso para testes de quimiotaxia *in vitro*.

Por outro lado, o tratamento com as substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2 (Figura 45/E), DFQ1 (Figura 45/F) e DFQ2 (Figura 45/G) mostrou que essas substâncias são desprovidas de efeitos polarizador, não sendo capazes de induzir alterações no comportamento locomotor de leucócitos humanos, cujas células em suspensão mantiveram predominantemente sua forma esférica.

#### 4.4.3.3 Quimiotaxia

Como anteriormente citado, a resposta inflamatória envolve várias etapas, com o objetivo maior de recrutar populações celulares distintas, capazes de eliminar o agente causal, com concomitante reparo do tecido lesado. Quando este processo se torna exacerbado, ultrapassando os seus efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais dessas etapas.

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo as primeiras células a chegar às áreas de lesão. Aí, desempenham inúmeras funções com a finalidade de eliminar o agente agressor. A locomoção por si só envolve uma série de fases, incluindo alterações das propriedades de adesividade, de forma e de orientação da célula em estudo.

Neste trabalho em particular, mesmo com os resultados negativos de polarização, investigou-se o potencial da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 em interferir no recrutamento de fagócitos, etapa fundamental da resposta inflamatória, utilizando-se o método de Boyden. Para tanto, foram realizados duas séries de experimentos; inicialmente, testou-se a capacidade da FQ, do DFQ1 e do

DFQ2 serem quimioatratores para GNC humanos. Para tanto, essas substâncias foram adicionadas ao compartimento inferior das câmaras, separado do superior por filtros de polycarbonato contendo poros de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para fins de comparação de efeito, utilizou-se a caseína, uma proteína reconhecidamente dotada de potente atividade quimiotática sobre GNC humanos (MCCUTCHEON, 1955; SOLYMOSSY *et al.*, 1986) e para a qual os dados foram normalizados em 100% (Figura 46/A). Em um segundo momento, as células foram previamente expostas a FQ, ao DFQ1 e ao DFQ2 antes de serem estimuladas a migrar contra um gradiente de caseína. Os resultados estão ilustrados na Figura 46/B.

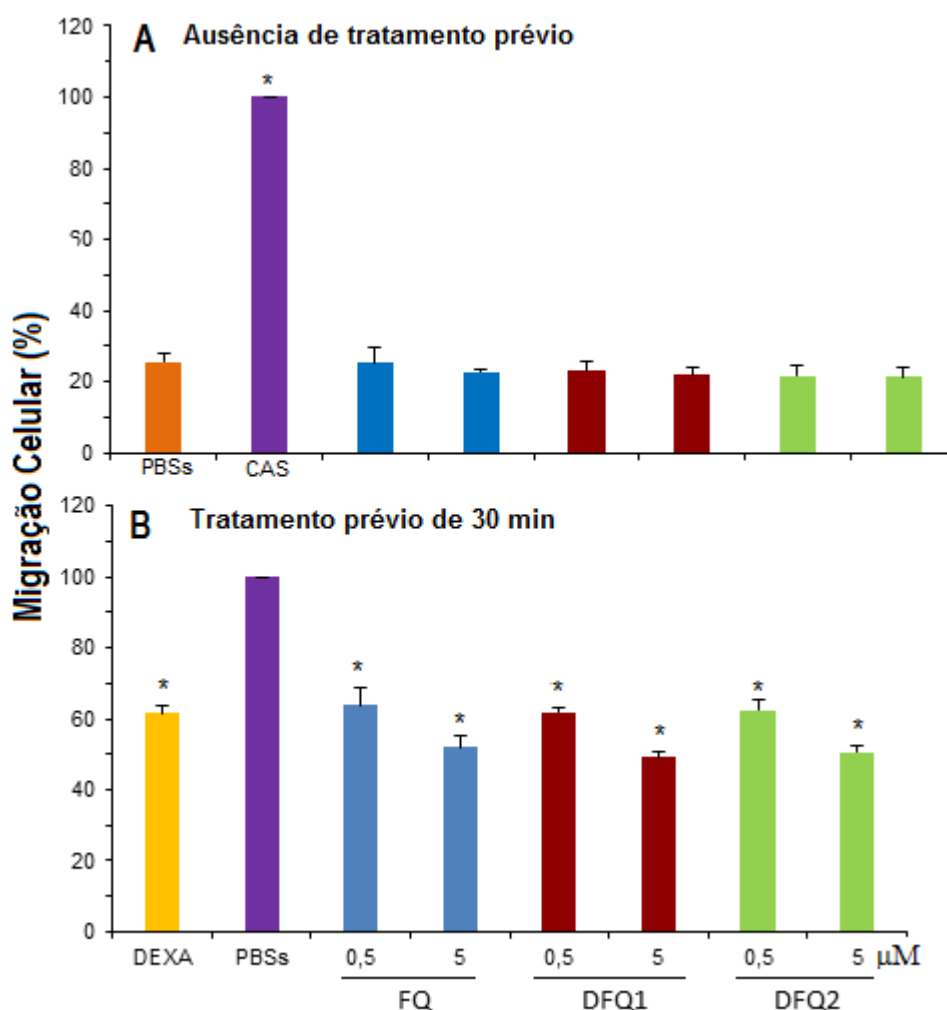


FIGURA 46 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS SUBSTÂNCIAS FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS HUMANOS.

NOTA: Granulócitos (GNC) obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram expostos às concentrações indicadas das substâncias Fenilquinolina (FQ) e dos derivados modificados DFQ1 e DFQ2 e de caseína (CAS), adicionadas ao compartimento inferior de câmaras de Boyden, e estimulados a migrar por noventa minutos, a 37°C (A). Granulócitos obtidos de doadores saudáveis foram tratados, a 37°C, por trinta minutos, com as concentrações indicadas das substâncias Fenilquinolina (FQ) e dos derivados modificados DFQ1 e DFQ2 e induzidos a migrar, em câmara de Boyden, por noventa minutos, contra um gradiente de 0,5% (p/v) de caseína (B). Dexametasona foi utilizada como controle de inibição no experimento (B). As colunas representam a porcentagem média  $\pm$  DP de GNC recuperados do compartimento inferior da câmara de Boyden em relação à população controle exposta ao PBSs. [\*]  $p < 0,001$  (n = 4).

A FQ, assim como o DFQ1 e o DFQ2, independente da concentração, parecem não ser dotados da habilidade de atrair GNC humanos, demonstrado pelo comportamento semelhante à população controle, somente exposta ao PBSs, e em franco contraste com o efeito causado pela caseína (n=4), onde

número significativamente maior de células ( $98,92 \pm 3,40\%$ ,  $p < 0,001$ ) migrou para o compartimento inferior das câmaras (Figura 46/A).

Entretanto, exposição prévia de GNC humanos com concentrações crescentes de FQ e seus derivados DFQ1 e DFQ2 resultaram em inibição significativa ( $n=4$ ;  $p < 0,001$ ) da quimiotaxia induzida por caseína dependente da dose, com apenas  $51,96 \pm 3,36$ ,  $49,25 \pm 1,63$  e  $50,48 \pm 2,10\%$ , respectivamente, de células tratadas com soluções das substâncias a  $5 \mu\text{M}$  migrando para o compartimento inferior da câmara (Figura 46/B). Este efeito inibitório foi, inclusive, superior àquele demonstrado pelas células tratadas com Dexametasona, medicamento usado frequentemente como padrão de inibição de quimiotaxia de GNC em estudos semelhantes (LOMAS *et al.*, 1991; ZENTAY *et al.*, 1999a), onde  $61,47 \pm 2,41\%$  ( $n=4$ ;  $p < 0,001$ ) das células foram recuperadas.

Na Bolívia, estudos da medicina tradicional à base de plantas têm mostrado que a Evanta pode ser utilizada para o tratamento de leishmaniose e outras doenças parasitárias (BOURDY *et al.*, 2000, DEHARO *et al.*, 2004) em função de que seus alcaloides quinolínicos isolados e caracterizados a partir de diferentes órgãos da planta, em particular a FQ, seu alcaloides majoritário, têm efeito leishmanicida (FOURNET *et al.*, 1993; FOURNET *et al.*, 1994b). Estudos recentes, também, demonstraram que, além do potencial leishmanicida, o extrato preparado de Evanta, assim como a FQ, possuem efeitos que vão além da ação direta sobre o parasito, interferindo também na ativação de linfócitos, interferindo com a proliferação e produção de  $\text{IFN-}\gamma$  induzida por anticorpos anti-CD3 e concanavalina A, o que implica no controle da resposta inflamatória observada na infecção crônica por leishmania (CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2009).

Estudos mais recentes também demonstraram que alcaloides quinolínicos isolados da Evanta apresentaram a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e controlar a inflamação quando usada no tratamento de infecções ocasionadas por leishmanias em ratos, reduzindo a resposta de linfócitos de memória, mediada pela produção de  $\text{IFN-}\gamma$ . Ainda, a produção  $\text{IFN-}\gamma$ , de IL-12 e de TNF também foi suprimida (CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2013b). Coletivamente, esses estudos sugerem que a

resposta inflamatória e a resposta imune anti-inflamatória são primordiais para um efetivo controle da lesão resultante da leishmaniose.

Os resultados de nossos estudos sugerem que, embora com intensidade variável, a FQ e seus derivados apresentam ação anti-inflamatória por inibirem a quimiotaxia de GNC humanos, uma ação adicional desses alcaloides na supressão do processo inflamatório.

#### 4.4.3.4 Imunomodulação

Após a instalação de um agente patogênico, o organismo reage para a eliminação do mesmo em ação integrada entre os fagócitos, protagonistas da reação inflamatória, e as células do sistema imunitário ou imunológico. Isso é observado também na leishmaniose, a partir da inoculação das formas promastigotas na pele, em que se inicia uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro, que determinará a expressão clínica da leishmaniose. Vários setores do sistema imunológico são ativados, mas a resposta imune celular, específica para as leishmanias, tem papel crucial no controle final da infecção.

Uma vez que vários estudos têm demonstrado a capacidade imunomodulatória de alcaloides quinolínicos, particularmente da FQ, extraídos da *G. longiflora* (CALLA-MAGARINOS *et al.*; 2009, CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2013a; CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2013b), avaliar a ação da FQ e dos derivados DFQ1 e DFQ2 sobre o potencial imunomodulatório de linfócitos humanos em seu estado basal e quando estimulados por PHA tornou-se um dos objetivos deste trabalho. Para tanto, estudou-se os seus efeitos sobre a capacidade de ativação de células MNC obtidas de sangue periférico de indivíduos sadios em ensaios de transformação blástica, e sobre sua capacidade proliferativa.

A capacidade que linfócitos T têm de serem ativados *in vitro* e proliferar quando expostos a mitógenos tem sido usada como um instrumento para avaliar o *status* funcional dessas células e tem aplicação prática em laboratórios de imunologia clínica, com o objetivo de diagnosticar indivíduos portadores de distúrbios relacionados à defesa imunológica. Tem, também,

proporcionado ferramentas para elucidar os mecanismos que envolvem as respostas imunológicas, assim como se tornou útil para o estudo do efeito imunomodulador de várias substâncias.

Neste contexto, um dos meios de se estudar a ativação de células e, em particular, a de linfócitos, é pela alteração de sua morfologia, observada sob microscopia de imersão, em preparações fixadas e coradas. Linfócitos se caracterizam como células pequenas e arredondadas, com cerca de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, elevada relação núcleo-citoplasma; seu citoplasma é geralmente escasso, de coloração azul, sem a presença de granulação específica; seu núcleo arredondado é denso, com cromatina apresentando-se com agregados irregulares e a presença de estruturas semelhantes a nucléolos é eventual, porém mal definidos quando presentes. Linfócitos transformados pela ação de PHA apresentam-se com morfologia característica de células primitivas ou blásticas (linfoblastos), sendo células maiores do que linfócitos não-ativados, com cerca de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro, citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como uma área não corada ao redor do núcleo; este, por sua vez, se apresenta geralmente com cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos proeminentes e delineados (LEE *et al.*, 1999).

Seguindo esta linha de pensamento, o potencial imunomodulador da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 foi avaliado em dois momentos: primeiro, sobre a ativação celular de MNC, ou transformação blástica, pela análise morfológica dessas células em preparações coradas, e, segundo, pelo seu efeito sobre o comportamento proliferativo de MNC, descrito como Índice de Proliferação (IP), ambos após 5 dias de cultivo na presença de concentrações crescentes dos alcaloides. Em paralelo, investigou-se seus efeitos sobre a proliferação de MNC na presença de PHA.

A ativação de linfócitos acompanhada morfológicamente pela análise de citocentrifugados preparados de populações de MNC incubadas por cinco dias somente em meio de cultura convencional demonstrou que, em média,  $87,3 \pm 2,8\%$  dessas células permaneceram com morfologia de linfócitos (Figura 47/A), confirmando dados da literatura e sugerindo que essas células por si só, não têm a habilidade de se ativar. Entretanto, quando foram simultaneamente

expostas a PHA, somente  $14,5 \pm 2,8\%$  das células permaneceram com a morfologia característica de linfócitos, sendo o restante representado por linfoblastos, ilustrados na Figura 47/B.

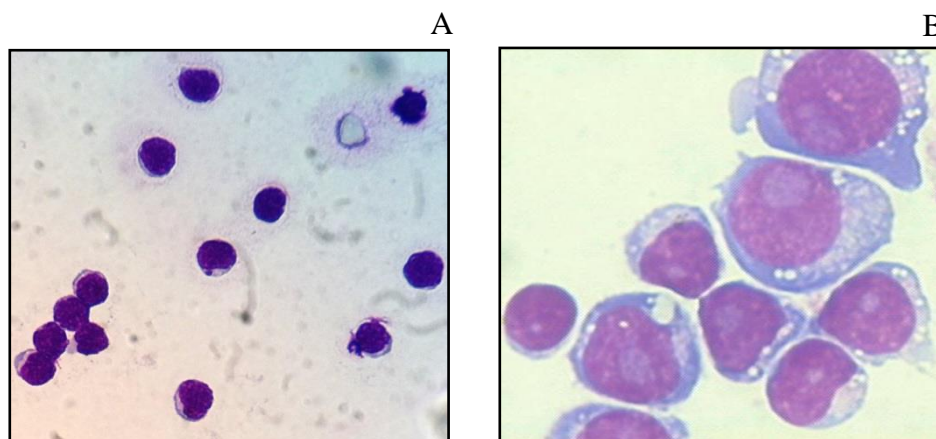


FIGURA 47 - AÇÃO DA FITO-HEMAGLUTININA SOBRE A MORFOLOGIA DE LINFÓCITOS. NOTA: Citocentrifugados preparados de células mononucleares humanas obtidas após centrifugação com gradiente densidade e incubadas por 5 dias a 37°C, em atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>, foram corados com May-Grunwald-Giemsa e observados sob microscopia de luz demonstraram morfologia predominante de linfócitos (A). Quando fito-hemaglutinina foi adicionada ao meio, os linfócitos ativados passaram a apresentar a morfologia de blastos (B) (magnificação: 1000x).

Em seguida, células MNC foram expostas as mesmas condições de cultura, mas na presença de diferentes concentrações de FQ, DFQ1 e DFQ2. Com os resultados apresentados na Figura 48, foi possível constatar que nenhuma dessas substâncias, independente da concentração, interferiu na transformação blástica ou na proliferação de linfócitos, indicando serem essas substâncias desprovidas da capacidade de ativar linfócitos humanos ou de promover sua proliferação.

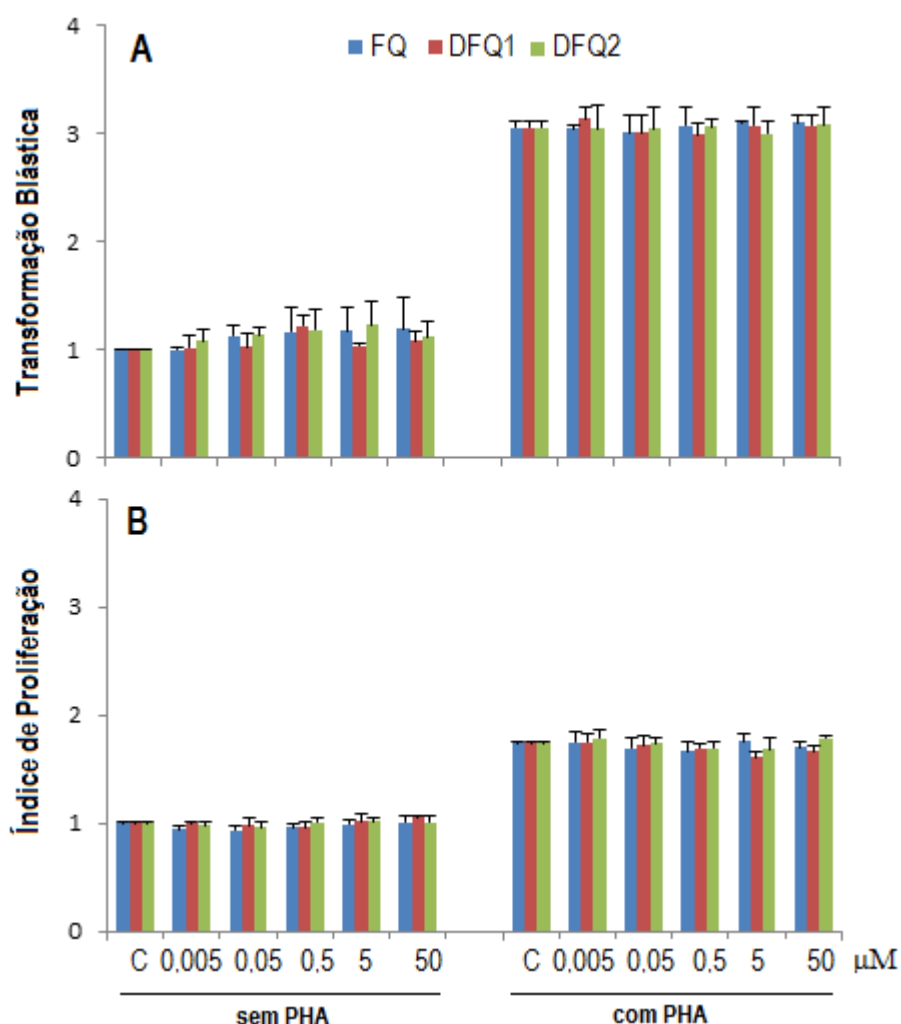


FIGURA 48 - AÇÃO DA FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 SOBRE A MORFOLOGIA E A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.

NOTA: Mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com as doses indicadas de FQ, DFQ1 e DFQ2 e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Em alguns experimentos meio contendo Fito-hemaglutinina (PHA) foi adicionado. Cada coluna representa a média  $\pm$  DP da relação entre o número de linfócitos e o de blastos ou do número de células recuperadas dos ensaios contendo as substâncias e o controle (C) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Como visto anteriormente, a resposta dos linfócitos a antígenos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal, em contraste com a sua resposta a mitógenos *in vitro*, que é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blástica e, muitas vezes, também a proliferar. Esta propriedade favorece estudos experimentais com a PHA, uma lectina extraída e purificada de *Phaseolus vulgaris* que tem a habilidade de estimular *in vitro* sub-populações de células T humanas levando-as a proliferar (MYERS, 1995).



Como a PHA já havia demonstrado competência para estimular a proliferação de linfócitos humanos na metodologia proposta, avaliou-se a capacidade da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 em interferir na proliferação dessas células quando previamente ativados por exposição ao mitógeno. Os resultados desta avaliação estão demonstrados na Figura 48 e demonstraram que, em nenhuma das concentrações ensaiadas, essas substâncias alteraram os resultados de transformação blástica (Figura 48/A) ou de proliferação de linfócitos induzida por PHA (Figura 48/B), indicando serem desprovidas da capacidade de atuar também sobre linfócitos humanos previamente ativados.

Como visto na introdução deste trabalho, a interação de um mitógeno como a fito-hemaglutinina com o receptor das células T (TcR), por exemplo, inicia, na célula, eventos que envolvem o recrutamento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e a ativação simultânea de várias enzimas. Neste contexto e devido aos efeitos observados com essas substâncias sobre a quimiotaxia de granulócitos, a qual também envolve íons  $\text{Ca}^{2+}$ , a ausência de atividade foi causa de surpresa. Entretanto, na literatura não há estudos da FQ relacionados à atividade imunomoduladora sobre MNC humanos e os ensaios aqui descritos mostraram, pelo menos nos modelos propostos, ausência de ação tanto da FQ como de seus derivados sobre linfócitos humanos.

#### 4.4.3.5 Efeito da FQ, do DFQ1 e do DFQ2 na expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos periféricos por citometria de fluxo

Em face a uma lesão celular, independentemente do agente agressor, uma série de modificações no tecido conjuntivo vascularizado ocorre, com acúmulo de líquidos e recrutamento de elementos celulares com funções específicas, particularmente granulócitos neutrófilos, ou polimorfonucleares, e macrófagos, ambos fagócitos por excelência, que objetivam a eliminação rápida do agente agressor e a reparação do tecido lesado, caracterizando a resposta inflamatória aguda (COTRAN *et al.*, 1994).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios, destacam-se os GNC circulantes no sangue periférico. Dentre

esses, os neutrófilos, que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microrganismos, acumulando-se rapidamente no sítio de lesão. Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de MNC, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (COTRAN, *et al.*, 1994).

Entretanto, o recrutamento só ocorre quando as células podem aderir-se a proteínas da matriz extracelular (MEC). Vários estudos demonstram que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (MACKAI E ROSEN, 2000). Experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na MEC (BOKOCH, 1995; DEKKER E SEGAL, 2000).

Muitas dessas funções são decorrentes da interação entre um ligante e receptor de integrinas das subfamílias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , expressos tanto nos leucócitos circulantes como nas paredes dos vasos e do endotélio subjacente (SPRINGER, 1990), e o estudo do padrão de sua presença na superfície celular é central para o entendimento de processos patológicos, uma vez que drogas que interferem nesse mecanismo têm aplicação potencial como agentes anti-inflamatórios.

Com a intenção de se observar os efeitos da FQ e de seus derivados sobre a modulação das moléculas de adesão em linfócitos, monócitos e granulócitos periféricos de indivíduos sadios, utilizou-se a citometria de fluxo como ferramenta, após exposição dos leucócitos, por 24 h, sob contínua rotação, a 5 e 50  $\mu$ M dessas substâncias.

Uma estratégia de seleção, ilustrada na Figura 49, foi empregada para separar as populações leucocitárias de interesse e, simultaneamente, minimizar interferências de debris e/ou outras células às quais os anticorpos poderiam se ligar de forma inespecífica (SHAPIRO, 1995). Assim, janelas específicas foram traçadas, baseadas no tamanho (FSC – *forward side scatter*) e na complexidade interna (SSC – *side light scatter*) que são distintas para cada subpopulação de leucócitos (CIVIN e LOKEN, 1987), onde R1 especificou

a janela para linfócitos (LIN); R2, para monócitos (MON) e R3, para granulócitos (GNC).

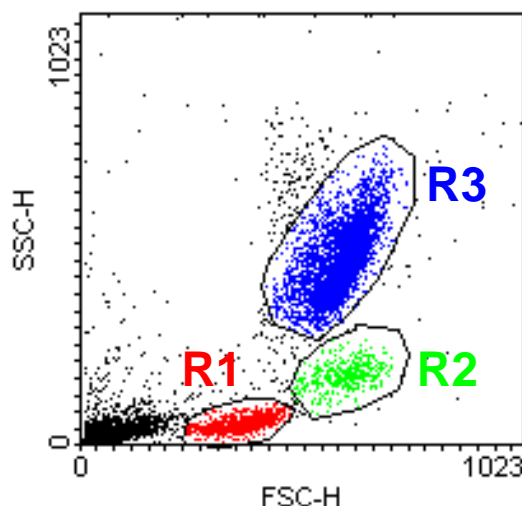


FIGURA 49 - ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADEÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO.

NOTA: As características de complexidade interna (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H) foram utilizadas para distinguir cada população de leucócitos humanos e definir as regiões para a análise da expressão de moléculas de adesão. R1 denota a região delimitada para linfócitos, R2 para monócitos e R3 para granulócitos. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

Analisando as características de tamanho e complexidade interna, linfócitos, monócitos e granulócitos obtidos de amostras de voluntários sadios usadas neste trabalho, mostraram distribuição similar à inicialmente descrita por Civin e Loken (1987) e consagrada pelo uso em laboratórios de análises clínicas de rotina.

Em todas as determinações citométricas, um mínimo de  $5 \times 10^4$  células foi analisado e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar marcada com o anticorpo monoclonal. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite. Os dados foram analisados usando o *software* WinMDI 2.8 e os resultados estão apresentados como a porcentagem média de expressão mais ou menos um desvio padrão (DP) de, pelo menos, três experimentos independentes e compõem a Tabela 11.

TABELA 11- INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM A FENILQUINOLINA (FQ), DFQ1 E DFQ2 SOBRE A EXPRESSÃO DE LFA-1, VLA-4 E VLA-5 SOBRE AS DIFERENTES POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS HUMANOS

<b>População de Leucócitos</b>	<b>LFA-1</b>	<b>VLA-4</b>	<b>VLA-5</b>
<b>Linfócitos</b>			
<b>Controle</b>	96,2±2,4	98,5±1,6	99,4±0,3
<b>FQ 5</b>	96,3±0,8	99,7±1,2	99,6±0,8
<b>FQ 50</b>	95,7±1,4	98,9±0,8	99,4±1,2
<b>DFQ1 5</b>	96,8±2,3	99,5±1,9	97,8±0,5
<b>DFQ1 50</b>	94,9±2,6	99,1±2,8	99,3±1,5
<b>DFQ2 5</b>	95,4±3,2	99,1±3,2	99,2±2,3
<b>DFQ2 50</b>	97,5±1,8	99,8±1,5	98,3±1,2
<b>Monócitos</b>			
<b>Controle</b>	79,7±0,5	95,8±2,9	75,2±1,9
<b>FQ 5</b>	81,7±2,8	97,0±0,6	75,6±1,3
<b>FQ 50</b>	78,2±3,2	95,7±1,8	74,2±0,8
<b>DFQ1 5</b>	80,3±0,8	94,4±3,5	76,2±2,3
<b>DFQ1 50</b>	82,4±1,3	96,5±0,6	75,1±0,2
<b>DFQ2 5</b>	78,1±1,8	95,9±2,3	74,4±1,9
<b>DFQ2 50</b>	77,7±3,8	96,2±1,6	72,8±2,3
<b>Granulócitos</b>			
<b>Controle</b>	98,1±0,8	22,8±0,9	5,5±2,4
<b>FQ 5</b>	97,2±4,2	23,5±1,4	5,4±0,5
<b>FQ 50</b>	97,0±0,2	22,1±0,8	5,9±1,5
<b>DFQ1 5</b>	98,5±3,2	24,8±1,3	5,6±3,2
<b>DFQ1 50</b>	97,8±2,1	21,6±0,7	4,8±2,6
<b>DFQ2 5</b>	98,2±0,5	24,3±2,5	5,5±3,1
<b>DFQ2 50</b>	95,4±1,2	23,9±2,9	5,3±1,4

NOTA: Leucócitos de sangue periférico de voluntários sadios foram expostos a 5 e 50  $\mu$ M das substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2 por 24 h, a temperatura ambiente e sob contínua agitação. Em seguida, foram marcados com anticorpos monoclonais para LFA-1, VLA-4 e VLA-5 e analisados por citometria de fluxo para expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 usando as estratégias descritas na Figura 49, onde um mínimo de  $5 \times 10^4$  células foi avaliado. Os resultados demonstrados na tabela representam a porcentagem média de expressão  $\pm$  DP de três experimentos independentes.

Como demonstrado na Tabela 11, a expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 foi observada em todas as populações leucocitárias analisadas (controles) e estão de acordo com os valores relatados na literatura. Entretanto, os resultados demonstram que o tratamento por 24 h com as substâncias FQ, DFQ1 e DFQ2, independente da concentração, não alterou o nível de expressão dessas integrinas em nenhuma das populações analisadas.

#### 4.4.3.6 Avaliação da migração celular

O reparo dos tecidos no processo de cicatrização de feridas é regulado por uma resposta inflamatória, a qual, por sua vez, é caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório composto por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), seguido de macrófagos (MARTIN e LEIBOVICH, 2005). Quando adequadamente estimulados por prostaglandinas, estas células produzem mediadores, tais como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , e proteoglicanos, tais como o PF4, que estimulam a remodelação da MEC (TELLER e WHITE, 2009). Os neutrófilos possuem, ainda, um arsenal de proteínas antimicrobianas e espécies reativas de oxigênio que são capazes de degradar agentes patogênicos. No entanto, este sistema de defesa pode não somente ser nocivo para os organismos patogênicos, mas também pode ter um efeito prejudicial sobre os componentes do tecido do hospedeiro (NEMETH e MOCSAI, 2012).

Alguns ensaios de migração de células *in vitro* podem ser utilizados na investigação da influência de várias substâncias no processo de cicatrização celular (FISCHER *et al.*, 1990; YARROW *et al.*, 2004). O ensaio de *scratch* em particular compreende um método *in vitro* clássico utilizado para estudar a migração celular e a biologia subjacente na cicatrização de feridas (YARROW *et al.*, 2004). Uma de suas vantagens é a adequação especial para o estudo da regulação da migração celular por interação das células com a MEC, possibilidade de mimetização da migração celular *in vivo* e analisar as interações célula-célula, além de o método ser compatível com a microscopia, o que permite a análise dos acontecimentos de sinalização intracelular (LIANG *et al.*, 2007).

O ensaio de *scratch* compreende, de fato, a segunda fase do processo cicatricial, que se caracteriza pela proliferação e migração tanto de queratinócitos quanto de fibroblastos (GURTNER *et al.*, 2008). Nesse sentido, os fibroblastos estão envolvidos na produção de colágeno, o que os torna uma das principais células envolvidas na cicatrização, cuja função principal é a manutenção da integridade do tecido conjuntivo pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

Uma vez que a FQ, assim como seus derivados, mostrou-se com toxicidade relativamente baixa para as células McCoy ao mesmo tempo em

que impediu a mobilidade de GNC em baixíssimas concentrações nos ensaios de quimiotaxia, resolveu-se avaliar qual seria a colaboração dessas substâncias na recuperação de uma lesão usando ensaios de *scratch* como modelo. Assim, sulcos mimetizando lesões foram realizados sobre um tapete de células McCoy (100% de confluência) e cada uma das substâncias em estudo foram adicionadas. Fotomicrografias tiradas no momento da confecção dos sulcos e após 24 h foram usadas para monitorar a capacidade dessas substâncias em promover a proliferação/migração dos fibroblastos, culminando no fechamento desses sulcos e o restabelecimento do tapete celular. Para tanto, a percentagem de área restabelecida de crescimento foi usada como instrumento de medida. O tratamento das células com soro fetal bovino a 10% foi usado somente para monitorar a recuperação da lesão, cuja recuperação média foi de 96,18%.

Como mostra a Figura 50, o tratamento das lesões com DFQ1 ou DFQ2 levou à recuperação progressiva da área lesionada de acordo com a dose de exposição, sendo inclusive superior a 50% a 100  $\mu$ M, tanto para o DFQ1 ( $63,71 \pm 5,69\%$ ;  $p < 0,0001$ ) como para o DFQ2 ( $57,09 \pm 4,03\%$ ;  $p < 0,001$ ) e significativamente melhor quando comparadas às culturas mantidas com 1% de soro fetal bovino e usadas como controle. Esses resultados podem ser melhor observados nas fotomicrografias correspondentes aos tratamentos, ilustradas na Figura 51.

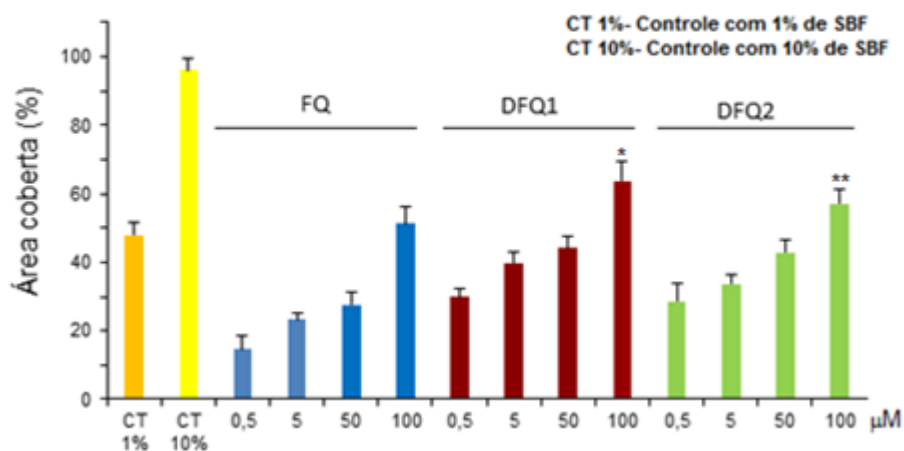


FIGURA 50 - EFEITO DA FENILQUINOLINA E DOS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2 EM ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE LESÃO *IN VITRO*.

NOTA: Culturas confluentes de células McCoy foram lesionadas e, em seguida adicionadas das concentrações indicadas de FQ, DFQ1 e DFQ2 por 24 h. CT 1% (Controle contendo 1% de SBF), CT 10% (Controle contendo 10% de SBF). Em seguida, as culturas foram fotografadas e as áreas recuperadas foram medidas como auxílio do Programa Photoshop 6.0. Os resultados estão expressos como a média±DP; [\*]  $p < 0,05$  e [\*\*]  $p < 0,001$  ( $n = 3$ ).

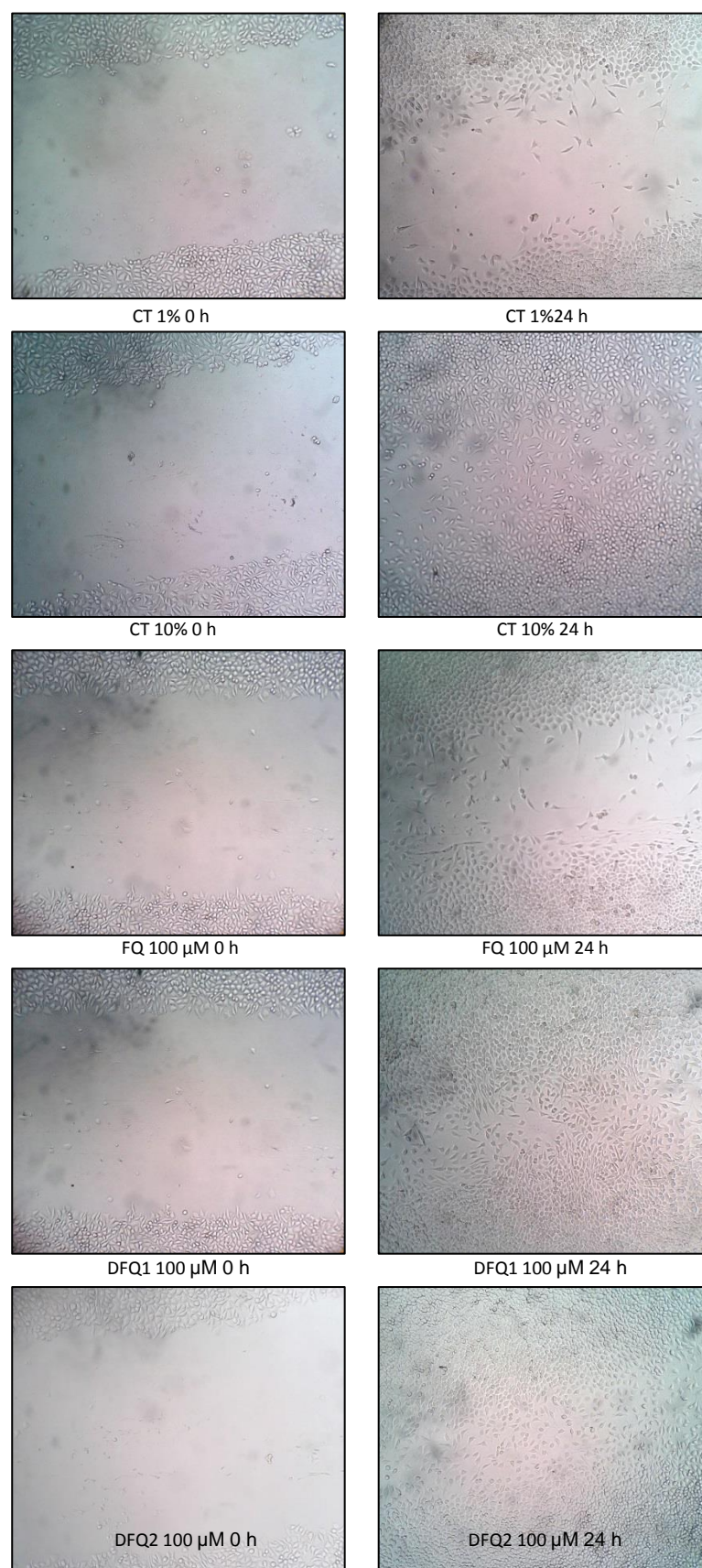


FIGURA 51 - EFEITO DA EXPOSIÇÃO POR 24 H DE CULTURAS CONFLUENTES DE CÉLULAS MCCOY A FENILQUINOLINA E SEUS DERIVADOS DFQ1 E DFQ2.



## 5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a partir do processo de biotransformação com fungos do gênero *Aspergillus* com o substrato 2-fenilquinolina (FQ), foram obtidos os derivados DFQ1 e DFQ2. A biotransformação com o substrato 2-*n*-pentilquinolina não levou a obtenção de nenhum derivado.

Para a obtenção do DFQ1, um composto ainda não descrito na literatura, o fungo responsável pela modificação na molécula original foi o *A. fumigatus*, com hidroxilações nas posições C5 e C6 do anel A. O derivado DFQ2 foi obtido por ação do *A. flavus*, com uma hidroxilação na posição C4' do anel C.

Na avaliação da atividade biológica sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, as substâncias mostraram significativa atividade leishmanicida de maneira dependente da dose, sendo o DFQ1 o mais ativo contra as formas promastigotas, em particular de *L. amazonensis* ( $CI_{50} = 5,41 \pm 0,20$  após 24 h de tratamento;  $CI_{50} = 0,44 \pm 0,18$  após 48 h de tratamento e  $CI_{50} = 0,24 \pm 0,14$   $\mu$ M após 72 h de tratamento).

Relevante se faz notar que as modificações estruturais foram capazes de aumentar a eficácia da substância precursora em todas as concentrações e tempos testados. Alterações causadas na estrutura dos parasitos foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão, confirmando a atividade citotóxica das substâncias.

Os resultados dos ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória indicaram uma ação adicional desses alcaloides na supressão do processo inflamatório ao inibirem, de forma significativa, a quimiotaxia de granulócitos humanos induzida pela caseína, sendo esse efeito até mesmo superior ao demonstrado pela Dexametasona.

Além da ação leishmanicida potencializada e do efeito inibitório sobre a mobilidade de granulócitos, os resultados demonstraram que os alcaloides obtidos por biotransformação da FQ apresentam potencial para auxiliar na recuperação de tecidos lesionados, ação até o momento não descrita na literatura para essa classe de compostos.

Embora estudos em modelos vivos e em outros sistemas sejam necessários, o conjunto de resultados apresentados nesta tese apresenta

relevância do ponto de vista de novos medicamentos para o tratamento de leishmaniose, corroborando em parte com dados de outros estudos e trazendo mais novidades com relação ao potencial de ação, e justificando a grande utilização da planta *Galipea longiflora* pela população boliviana para o tratamento de feridas ocasionadas pela leishmaniose.

## 6 REFERÊNCIAS

ADRIO, J. L., DEMAINE, A. L. Microbial cells and enzymes : A century of progress. In: Barredo, J. L. **Methods in biotechnology: Microbial enzymes and biotransformations**. Totowa: NJ. Humana Press Inc, 2005. p. 1-29.

AKIYAMA, S. K., NAGATA, K., YAMADA, K. M. Cell surface receptors for extracellular matrix components. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1031, n.1, p.91-110. 1990.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF. M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. New York: Butterworth Heinemann. 2002.

ALCOLEA, P. J., ALONSO, A., GOMEZ, M. J., SANCHEZ-GOROSTIAGA, A., MORENO-PAZ, M., GONZALEZ-PASTOR, E., TORANO, A., PARRO, V., LARRAGA, V. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, p.31. 2010.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J., MARZOCHI, M. C. A., MOREIRA, J. S., SCHOBACH, A. O., MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciência, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 3, p.853-882. 2003.

ARAKAWA, N. S. **Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de Vigueira robusta**. 144f. Tese (Doutorado), Departamento de Ciências Farmacêuticas/USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2007.

ARNAOUT, M. A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules (CD18/CD11). **Blood**, v. 75, p.1037-1050. 1990.

BANULS, A. L., HIDE, M., PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol**, v. 64, p.1-109. 2007.

BARREIRO, E. J., FRAGA, C., A, M. **Química Medicinal: As bases Moleculares da Ação de Fármacos**. Porto Alegre. 2008.

BEN-BARUCH, A., MICHIEL, D. F., OPPENHEIM, J. J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n.20, p.11703-11706. 1995.

BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A. M., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **Int J Parasitol**, v. 37, n.10, p.1063-1075. 2007.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, v. 86, p.1648-1660. 1995.

BOMPART, D., NUNEZ-DURAN, J., RODRIGUEZ, D., KOUZNETSOV, V. V., GOMEZ, C. M. M., SOJO, F., ARVELO, F., VISBAL, G., ALVAREZ, A., SERRANO-MARTIN, X., GARCIA-MARCHAN, Y. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n.14, p.4426-4431. 2013.

BOURDY, G., DEWALT, S. J., CHAVEZ DE MICHEL, L. R., ROCA, A., DEHARO, E., MUNOZ, V., BALDERRAMA, L., QUENEVO, C., GIMENEZ, A. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **J Ethnopharmacol**, v. 70, n.2, p.87-109. 2000.

BROSTOFF, J., MALE, D. K. Clinical immunology - an illustrated outline. London: Mosby. 1994.

BUCK, C. A., HORWITZ, A. F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. **Annu Rev Cell Biol**, v. 3, p.179-205. 1987.

BURGERMEISTER, E., ENDL, J., SCHEUER, W. V. Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. **Eur J Pharmacol**, v. 466, n.1-2, p.169-180. 2003.

BURRIDGE, K., FATH, K., KELLY, T., NUCKOLLS, G., TURNER, C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Annu Rev Cell Biol**, v. 4, p.487-525. 1988.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.12, p.2141-2153. 2004.

CALLA-MAGARINOS, J., FERNANDEZ, C., TROYE-BLOMBERG, M., FREYSDOTTIR, J. Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause modify the maturation of human dendritic cells and their ability to stimulate allogeneic CD4<sup>+</sup> T cells. **Int Immunopharmacol**, v. 16, n.1, p.79-84. 2013a.

CALLA-MAGARINOS, J., GIMENEZ, A., TROYE-BLOMBERG, M., FERNANDEZ, C. An alkaloid extract of *Evanta*, traditionally used as anti-*Leishmania* agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells. **Scand J Immunol**, v. 69, n.3, p.251-258. 2009.

CALLA-MAGARINOS, J., QUISPE, T., GIMENEZ, A., FREYSDOTTIR, J., TROYE-BLOMBERG, M., FERNANDEZ, C. Quinolinic alkaloids from *Galipea longiflora* Krause suppress production of proinflammatory cytokines in vitro and control inflammation in vivo upon *Leishmania* infection in mice. **Scand J Immunol**, v. 77, n.1, p.30-38. 2013b.

CARLOS, T. M., HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p.2068-2101. 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . Global Health. Division of parasitic disease and malaria. Parasites-Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 08 de julho de 2015.

CHATTERJEE, P., KOUZI, S. A., PEZZUTO, J. M., HAMANN, M. T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n.9, p.3850-3855. 2000.

CHUNG, C. Y., POTIKYAN, G., FIRTEL, R. A. Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. **Mol Cell**, v. 7, n.5, p.937-947. 2001.

CIVIN, C. I., LOKEN, M. R. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. **International Journal of Cell Cloning**, v. 5, p.267-288. 1987.

CLARK, B. R., GALLAGHER, J. T., DEXTER, T. M. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. **Bailliere's Clinical Haematology**, v. 5, n.3, p.619-652, 1992.

COOKE, A., ZACCONE, P., RAINE, T., PHILLIPS, P. M., DUNNE, D. W. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? **Trends Parasitol**, v. 20, p. 316-321, 2004.

COLLINS, D. O., RUDDOCK, P. L., CHIVERTON DE GRASSE, J., REYNOLDS, W. F., REESE, P. B. Microbial transformation of cadina-4,10(15)-dien-3-one, aromadendr-1(10)-en-9-one and methyl ursolate by *Mucor plumbeus* ATCC 4740. **Phytochemistry**, v. 59, n.5, p.479-488. 2002.

CONTI, R., RODRIGUES, J. A. R., MORAN, P. J. S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v. 24, n.5, p.672-675. 2001.

COOPER, H. L. Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation. **Transplant Rev**, v. 11, p.3-38. 1972.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1994.

COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

CROFT, S. L. PKDL - a drug related phenomenon?. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n.1, p.10-11. 2008.

DA SILVA, M. F. L., ZAMPIERI, R. A., MUXEL, S. M., BEVERLEY, S. M., FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. **PLoS One**, v. 7, n.3. 2012.

DACIE, J. D. E. L., S. M. **Practical haematology**. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1995.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n.4, p.313-325. 2008.

DEHARO, E., BAELEMANS, R., GIMENEZ, A., QUENEVO, C., BOURDY, G. In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. **Phytomedicine**, v. 11, n.6, p.516-522. 2004.

DEKKER, L. V., SEGAL, A. W. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. **Science**, v. 287, n.5455, p.982-985. 2000.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n.4, p.455-463. 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n.5, p.305-318. 2004.

DESRIVOT, J., HERRENKNECHT, C., PONCHEL, G., GARBI, N., PRINA, E., FOURNET, A., BORIES, C., FIGADERE, B., HOCQUEMILLER, R., LOISEAU, P. M. Antileishmanial 2-substituted quinolines: In vitro behaviour towards biological components. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n.7, p.441-450. 2007.

FABER, K. **Biotransformation in organic chemistry**. 6 ed. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg. 2011.

FARNET, C. M., ZAZOPOULOS, E. Improving drug discovery from microorganisms. In: Zang, L. & Demains, A. L. (eds.). **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Totowa: Huma Press, 2005. p. 95-106.

FERGUSON, T. A., MIZUTANI, H., KUPPER, T. S. Two integrin-binding peptides abrogate T cell-mediated immune responses *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p.8072-8076. 1991.

FESKE, S., DRAEGER, R., PETER, H. H., EICHMANN, K., RAO, A. The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. **J Immunol**, v. 165, n.1, p.297-305. 2000.

FIALKOW, L., WANG, Y., DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n.2, p.153-164. 2007.

FISCHER, E. G., STINGL, A., KIRKPATRICK, C. J. Migration assay for endothelial cells in multiwells. Application to studies on the effect of opioids. **Journal of Immunological Methods**, v. 128, n.2, p.235-239. 1990.

FONTE, N. N. A complexidade das Plantas Medicinais : Enfoque Farmacêutico. In: Correia Jr, C.; Graça, L. R.; Sceffer, M. C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentos no Estado do Paraná - Diagnóstico e Perspectivas**. Curitiba: Emater, 2004. p. 24-45.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUNOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 41, n.1-2, p.19-37. 1994a.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUNOZ, V., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., BRUNETON, J. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n.4, p.859-863. 1993.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUNOZ, V., HOCQUEMILLER, R., ROBLOT, F., CAVE, A., RICHOMME, P., BRUNETON, J. Antiprotozoal Activity of Quinoline Alkaloids Isolated from *Galipea-Longiflora*, a Bolivian Plant Used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 8, n.3, p.174-178. 1994b.

FRANCK, X., FOURNET, A., PRINA, E., MAHIEUX, R., HOCQUEMILLER, R., FIGADERE, B. Biological evaluation of substituted quinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n.14, p.3635-3638. 2004.

FURA, A. Role of pharmacologically active metabolites in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 11, n.3-4, p.133-142. 2006.

GAHMBERG, C. G., VALMU, L., TIAN, L., KOTOVUORI, A., KOTOVUORI, P., HILDEN, T. J., FAGERHOLM, S., KANTOR, C., NURMINEN, T., IHANUS, T., TIAN, L. Leukocyte adhesion--an integrated molecular process at the leukocyte plasma membrane. **J Biosci rep**, v. 19, n.4, p.273-281. 1999.

GIMENEZ, A., AVILA, J. A., RUIZ, G., PAZ, M., UDAETA, E., TICONA, J. C., SALAMANCA, E., PAREDES, C., RODRIGUEZ, N., QUINTIS, K., FERAUDY, C., GUTIERREZ, I., CHUQUI, R., QUENEVO, C., DALENCE, M. F., BASCOPE, M. Estudios Químicos, Biológicos y Farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. **Rev. Boliv. Quím**, v. 22, p.94-100. 2005.

GLAZER, A. N., NIKALDO, H. **Microbial technology: fundaments of applied microbiology**. New York: W. H. Freeman & Co. 1995.

GOPINATH, V. S., PINJARI, J., DERE, R. T., VERMA, A., VISHWAKARMA, P., SHIVAHARE, R., MOGER, M., KUMAR GOUD, P. S., RAMANATHAN, V.,

BOSE, P., RAO, M. V., GUPTA, S., PURI, S. K., LAUNAY, D., MARTIN, D. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. **Eur J Med Chem**, v. 69, p.527-536. 2013.

GREAVES, M., JANOSSY, G. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. **Transplant Rev**, v. 11, p.87-130. 1972.

GRIFFIN, G. K., NEWTON, G., TARRIO, M. L., BU, D. X., MAGANTO-GARCIA, E., AZCUTIA, V., ALCAIDE, P., GRABIE, N., LUSCINSKAS, F. W., CROCE, K. J., LICHTMAN, A. H. IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **Journal of Immunology**, v. 188, n.12, p.6287-6299. 2012.

GUILLON, J., FORFAR, I., MAMANI-MATSUDA, M., DESPLAT, V., SALIEGE, M., THIOLAT, D., MASSIP, S., TABOURIER, A., LEGER, J. M., DUFAURE, B., HAUMONT, G., JARRY, C., MOSSALAYI, D. Synthesis, analytical behaviour and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-a]quinoxalines as antileishmanial agents. **Bioorg Med Chem**, v. 25, p. 194-240. 2007.

GURTNER, G. C., WERNER, S., BARRANDON, Y., LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n.7193, p.314-321. 2008.

HANSON, J. R. The microbiological transformations of diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 9, p.139. 1992.

HATAM, G. R., BAHRAMI, S., RAZAVI, S. M., ORYAN, A. Isoenzyme and ultrastructural characterization of *Leishmania tropica* axenic amastigotes and promastigotes. **Parasitology Research**, v. 112, n.2, p.643-648. 2013.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n.1, p.11-25. 1992.

HYNES, R. O. Integrins: bidirection, allosteric signaling machines. **Cell**, v.10, n. 6, p.673-687. 2002.

ISOBE, Y., KATO, T., ARITA, M. Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. **Front Immunol**, v. 3, p.270. 2012.

JANNOSY, G., GREAVES, M. F. Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocytes to phytomitogens. **Clinical experimental immunology**, v. 9, p.483. 1972.

JAYANARAYAN, K. G., DEY, C. S. Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 27, n.5, p.313-320. 2002.



JOHANSSON, S., GORANSSON, U., LUIJENDIJK, T., BACKLUND, A., CLAESON, P., BOHLIN, L. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. **J Nat Prod**, v. 65, n.1, p.32-41, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

KIPPS, T. J. The cluster of differentiation antigens. Hematology. New York: McGraw -Hill. 2001, p. 141-152.

KONGSAEREE, P., PRABPAI, S., SRIUBOLMAS, N., VONGVEIN, C., WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n.5, p.709-711. 2003.

KOUZI, S. A., CHATTERJEE, P., PEZZUTO, J. M., HAMANN, M. T. Microbial transformations of the antimelanoma agent betulinic acid. **J Nat Prod**, v. 63, n.12, p.1653-1657. 2000.

LACROIX, I., BITON, J., AZERAD, R. Microbial models of drug metabolism: microbial transformations of Trimegestone (RU27987), a 3-keto-delta(4,9(10))-19-norsteroid drug. **Bioorg Med Chem**, v. 7, n.11, p.2329-2341. 1999.

LAISON, R., SHAW, J. J. New World Leishmaniasis- The Neotropical *Leishmania* Species. **Microbiology and Microbial Infections**, v. 5, p.242-266. 1998.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n.6, p.279-289. 2007.

LAMPUGNANI, M. G. Cell migration into a wounded area in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 96, p.177-182. 1999.

LAMPUGNANI, M. G., DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p.674. 1997.

LARSON, R. S., HIBBS, M. L., SPRINGER, T. A. The leukocyte integrin LFA-1 reconstituted by cDNA transfection in a nonhematopoietic cell line is functionally active and not transiently regulated. **Cell Regulation**, v. 1, p.359-367. 1991.

LAWRENCE, M. B., SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, p.859. 1991.

LAWRENCE, T., GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, n.2, p.85-94. 2007.

LEE, G. R., FOERSTER, J., LUKENS, J., PARASKEVAS, F., GREER, J. P., RODGERS, G. M. **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999.

LEWIS, S. L., VAN EPPS, D. E. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. **Inflammation**, v. 7, n.4, p.363-375. 1983.

LI, A. H., AHMED, E., CHEN, X., COX, M., CREW, A. P., DONG, H. Q., JIN, M. Z., MA, L. F., PANICKER, B., SIU, K. W., STEINIG, A. G., STOLZ, K. M., TAVARES, P. A. R., VOLK, B., WENG, Q. H., WERNER, D., MULVIHILL, M. J. A highly effective one-pot synthesis of quinolines from o-nitroarylcarbaldehydes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n.1, p.61-64. 2007.

LIANG, C. C., PARK, A. Y., GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n.2, p.329-333. 2007.

LOMAS, D. A., CHAMBA, M. I. A., STOCKLEY, R. A. The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. **Agents and Actions**, v. 33, n.3-4, p.279-285. 1991.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in organic synthesis. **Bioresource Technology**, v. 74, n.1, p.49-62. 2000.

MACHADO JR., J., A. FLORÃO, F.V.R. MATTANA, F.H. ROCHA, C.A.M. SANTOS, E A.M. WEFFORT-SANTOS. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p.645-655. 2006.

MACKAI, I. R., ROSEN, F. S. T-cell function and migration. **N Engl J Med**, v., p.1020-1034. 2000.

MADIGAN, M., T, MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice hall. 2000.

MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis. In: Maltezou, H, C., Gikas, A. **Tropical and emerging infectious diseases**. Kerala, Índia, 2010. p. 163-185.

MARTIN, P., LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v. 15, n.11, p.599-607. 2005.

MASMOUDI, A., MAALEJ, N., MSEDDE, M., SOUISSI, A., TURKI, H., BOUDAYA, S., BOUASSIDA, S., ZAHAF, A. Glucantime injection: benefit versus toxicity. **Med Mal Infect**, v. 35, p.42-45. 2005.

MCCUTCHEON, M. Chemotaxis and Locomotion of Leukocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 59, n.5, p.941-944. 1955.

MERCHANT, D. K., R. E MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Broken Arrow: Burgess Publishing. 1964.

MEREDITH, J. E., JR., WINITZ, S., LEWIS, J. M., HESS, S., REN, X. D., RENSHAW, M. W., SCHWARTZ, M. A. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. **Endocr Rev**, v. 17, n.3, p.207-220. 1996.

MICHALICK, RIBEIRO. 2011. Gênero Leishmania. In Neves, F. P. e. a. (ed.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 41-47.

MILLS, K. H., MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol**, V. 16, P.107-117. 2004.

MISHRA, B. B., KALE, R. R., SINGH, R. K., TIWARI, V. K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, n.2, p.81-90. 2009a.

MISHRA, B. B., SINGH, R. K., SRIVASTAVA, A., TRIPATHI, V. J., TIWARI, V. K. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n.1, p.107-123. 2009b.

MIYAZAWA, M., SUZUKI, Y., KAMEOKA, H. Biotransformation of (-)-cis-myrtanol and (+)-trans-myrtanol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. **Phytochemistry**, v. 45, p.935-943. 1997.

MURRAY, H. W., BERMAN, J. D., DAVIES, C. R., SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n.9496, p.1561-1577. 2005.

MYERS, R. L. **Immunology - a laboratory manual**. Dubuque: WCB Publishers 1995. 133 p.

NAKASHIMA, T., MAYUZUMI, S., INABA, S., PARK, J. Y., ANZAI, K., SUZUKI, R., KUWAHARA, N., UTSUMI, N., YOKOYAMA, F., SATO, H., OKANE, I., TSURUMI, Y., ANDO, K. Production of bioactive compounds based on phylogeny in the genus *Penicillium* preserved at NBRC. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, n.11, p.3051-3054. 2008.

NEMETH, T., MOCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunol Lett**, v. 143, n.1, p.9-19. 2012.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 6, n.9, p.754-765. 2008.

NEVES, D. N. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu. 2010.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n.3, p.215-234. 2000.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n.7, p.1022-1037. 2003.

NODARI, R. O., GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. (eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000. p. 11-25.

OPPENHEIM, M. M., ROSENSTREICH, D. L. **Mitogens in immunobiology**. New York: NY Academic Press. 1976.

PANIZ, M. A. E., DUFFEY, G. B., HORTON, L. E., TIRADO, M., REYS, J. O., PEREZ-ALVES, A. Intermediate/borderline disseminate cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol**, v. 52. p. 446-455. 2013.

MANSUETO, P., SEIDITA, A., VITALE, G., CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious diseases**, v. 12, p. 563-581. 2014.

PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: ArTmed. 2001.

PORTAL DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar. Disponível em: <<http://www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

PRASSAD, R., KUMAR, R., JAISWAL, P., SINGH, K. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. **Indian Journal Pediatrics**, v. 71, p.143-144. 2004.

QU, J., HOSOI, K., SHIMOJIMA, T., OI, T., IKEDA, K. Effects of FMLP and LPS on  $[Ca^{2+}]_i$  of peritoneal exudate polymorphonuclear leukocytes following onset of inflammation. **J Periodontal Res**, v. 30, n.3, p.153-158. 1995.

RABGAOUI, N., GUERIN, M. C., TORREILLES, J. Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. **Biochem Cell Biol**, v. 72, n.7-8, p.305-311. 1994.

RAO, A., LUO, C., HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p.707-747. 1997.

REEVES, G., TODD, I. **Lectures notes on immunology**. Oxford: Blackwell Science. 2000.

ROBERTS, S. M., TURNER, N., J., WILLETS, A., J., TURNER, M., K. **Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Microorganisms**. New York: Cambridge University Press. 1995.

ROITT, I. M., MALE, D. K., BROSTOFF, J. **Imunologia**. São Paulo: Manole. 2003.

SAÚDE, M. D. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília. 2013.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. New York. 1995.

SHAW, N. M., ROBINS, K. T., KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 345, n.4, p.425-435. 2003.

SHIMIZU, Y., VAN SEVENTER, G. A., HORGAN, K. J., SHAW, S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4<sup>+</sup> T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. **The Journal of Immunology**, v. 145, n.1, p.59-67. 1990a.

SHIMIZU, Y., VAN SEVENTER, G. A., HORGAN, K. J., SHAW, S. Regulated expression and function of three VLA ( ) integrin receptors on T cells. **Nature**, v. 345, p.250. 1990b.

SIDDIQUI, R. A., AKARD, L. P., GARCIA, J. G., CUI, Y., ENGLISH, D. Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. **J Immunol**, v. 162, n.2, p.1077-1083. 1999.

SILVEIRA, F. T., LAISON, R., CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special references to the diseases in Amazon Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 239-251. 2004.

SIMON, S. I., GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leucocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, n. 8, p. 151-185. 2005.

SIMMONS, D. L. The role of ICAM expression in immunity and disease. **Cancer Surveys: Cell Adhesion and Cancer**, v. 25, p.141. 1995.

SIMÕES, T. H. N. **Triagem de enzimas associadas a biotransformação de hidrocarbonetos a partir de metagenoma de sedimentos contaminados com petróleo e metais pesados**. 173f. Teses (Doutorado), Departamento de Biotecnologia/USP, Instituto Bitantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

SINGH, S. P., REDDY, D. C. S., RAY, M., SUNDAR, S. Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, n. 6, p. 899-905. 2006.

SIQUEIRA, A. M. 2011. Subfilo Mastigophora. In: Neves, D. N (Ed.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 37-40.

SOLYMOSSY, M., NAGY, Z., TOTH, G., ANTONI, F. Interaction of Casein with Human Polymorphonuclear Cells. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 35, n.3, p.293-301. 1986.

SOTO, J., TOLEDO, J. T. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.77-81. 2007.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p.425-434. 1990.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. **Cell**, v. 76, n.2, p.301-314, 1994.

STOUDT, T. H. The microbiological transformation of steroids. In: **Advances Applied Microbiology**. 2 ed, 1960.

STRAATHOF, A. J. J., PANKE, S., SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n.6, p.548-556. 2002.

STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n.4, p.491-493. 2003.

SUBRAMANIAN, H., GRAILER, J. J., OHLRICH, K. C., RYMASZEWSKI, A. L., LOPPNOW, J. J., KODERA, M., CONWAY, R. M., STEEBER, D. A. Signaling through L-selectin mediates enhanced chemotaxis of lymphocyte subsets to secondary lymphoid tissue chemokine. **Journal of Immunology**, v. 188, n.7, p.3223-3236. 2012.

TAKEUCHI, I., OZAWA, I., SHIGEMURA, K., HAMADA, Y., ITO, T., OHYAMA, A. [Syntheses of nitrogen-containing heterocyclic compounds. XXXVII. On the antimicrobial activity and syntheses of 2-phenylquinoline 1-oxides and phenyl-1,8-naphthyridines (author's transl)]. **Yakugaku Zasshi**, v. 99, n.5, p.451-457. 1979.

TELLER, P., WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surg Clin North Am**, v. 89, n.3, p.599-610. 2009.

TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., CREPALDI, P. H., SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ. 2013.

TIUMAN, T. S., SANTOS, A. O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS, B. P., NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n.8, p.525-532. 2011.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. **Microbiologia**. São Paulo: Ateneu. 1996.

TRAMA, J., LU, Q., HAWLEY, R. G., HO, S. N. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. **J Immunol**, v. 165, n.9, p.4884-4894. 2000.

UPADHAYAYA, R. S., DIXIT, S. S., FOLDESI, A., CHATTOPADHYAYA, J. New antiprotozoal agents: Their synthesis and biological evaluations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n.9, p.2750-2758. 2013.

VIEIRA, N. C., HERRENKNECHT, C., VACUS, J., FOURNET, A., BORIES, C., FIGADERE, B., ESPINDOLA, L. S., LOISEAU, P. M. Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n.10, p.684-689. 2008.

WANG, F. I., YANG, J. W., HUNG, S. Y., PAN, I. J. In vitro migratory responses of swine neutrophils to actinobacillus pleuropneumoniae. **Exp Anim**, v. 50, n.2, p.139-145. 2001.

WILKINSON, P. C. Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. **Journal of Immunological Methods**, v. 216, n.1-2, p.139-153. 1998.

WILKINSON, P. C. Cell Locomotion and Chemotaxis: Basic Concepts and Methodological Approaches. **Methods**, v. 10, n.1, p.74-81. 1996.

WILKINSON, P. C. Surface and cell membrane activities of leukocyte chemotactic factors. **Nature**, v. 251, n.5470, p.58-60. 1974.

WILKINSON, P. C., HASTON, W. S. Chemotaxis: an overview. **Methods Enzymol**, v. 162, p.3-16. 1988.

WRIGHT, S. D., DETMERS, P. A. Adhesion-promoting receptors on phagocytes. **Journal of Cell Science Suppl**, v. 9, p.99-120. 1988.

YARROW, J. C., PERLMAN, Z. E., WESTWOOD, N. J., MITCHISON, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnol**, v. 4, p.21. 2004.

ZELINSKI, T.;HAUER, B. Industrial biotransformations with fungi. **Mycota**, v. 10, p. 283-301. 2002.

ZENTAY, Z., SHARAF, M., QADIR, M., DRAFTA, D., DAVIDSON, D. Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide in vitro: Role of neutrophil interleukin-8 release. **Pediatric Research**, v. 46, n.4, p.406-410. 1999.

ZIGMOND, S. H. Orientation Chamber in Chemotaxis. **Methods Enzymol**, v. 162, p.65-72. 1988.